

F / BR 03 100202



RECEIVED	
20 JAN 2004	
WIPO	PCT

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Desenho Industrial
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0206903-2 de 20/12/2002.

Rio de Janeiro, 06 de Janeiro de 2004.

GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2011 1310 51 0125

Protocolo

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



PI0206903-2

depósito / /

(data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP.

1.2 Qualificação: UNIVERSIDADE 1.3 CGC/CPF: 60.453.032/0001-74

1.4 Endereço completo: Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino – São Paulo/SP –
CEP:05508-900

1.5 Telefone: ()

FAX:

(X) continua em folha anexa

2. Natureza:

2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada:

INVENÇÃO.....

3 Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

VIDE FOLHA ANEXA

→ ver Pef. 10388 e Escorregiment (X) continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº. _____ de _____ / _____ / _____

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito _____ Data de Depósito / / (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

() continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**
(Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: **DULCE ELENA CASARINI**
7.2 Qualificação: **Pesquisadora**
7.3 Endereço: **Rua Botucatu, 740 - São Paulo - SP.**
7.4 CEP: **04023-900** 7.5 Telefone:

(X) continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

2

() em anexo
9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

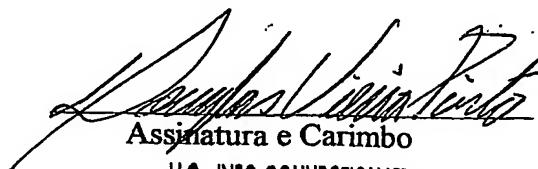
() em anexo
10. **Procurador (74):**
10.1 Nome e CPF/CGC: **LLC INFO CONNECTION LTDA. P. 0340**
CNPJ.: 86.915.246/0001-09
10.2 Endereço: **RUA HERMENGARDA, 60 SALA 403 – MÉIER - Rio de Janeiro - RJ**
10.3 CEP: **20.710-010** 10.4 Telefone **(21)3899-2920 e 3899-2002**

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	11.5 Relatório descritivo	31 fls.
11.2 Procuração	02 fls.	11.6 Reivindicações	04 fls.
11.3 Documentos de prioridade	fls.	11.7 Desenhos	07 fls.
11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	11.8 Resumo	01 fls.
11.9 Outros (especificar): Depositante (71), Título da Invenção (54), Inventor (72) - (Folha Anexa)			03 fls.
11.10 Total de folhas anexadas:			49 fls;

* Ver Pet. 10388 e anexos
12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Rio, 20 de dezembro de 2002.
Local e Data


Assinatura e Carimbo

LLC - INFO CONNECTION LTDA
Agente de Propriedade Industrial - 00340

FOLHA ANEXA

3

1. **Depositante (71): (Continuação)**

1.1 Nome: **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP**

1.2 Qualificação: **FUNDAÇÃO**

1.3 CGC/CPF: **43.828.151/0001-45**

1.4 Endereço completo: **Rua Pio XI, 1500 – Alto da Lapa – São Paulo – SP – CEP:05468 - 901**

1.5 Telefone: **(11) 3838 - 4000**

FAX:

FOLHA ANEXA

5

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

"MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I, MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, USO DO REFERIDO MARCADOR MOLECULAR, MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÉUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIAS E KIT PARA USO NO DIAGNÓSTICO."

6

FOLHA ANEXA

7. Inventor (72): (continuação)

(2)

7.1 Nome: ODAIR MARSON
7.2 Qualificação: Pesquisador
7.3 Endereço: Rua Botucatu, 740 - São Paulo - SP
7.4 CEP:04023-900
7.5 Telefone:

(3)

7.1 Nome: FRIDA LIANE PLAVNIK
7.2 Qualificação: Pesquisadora
7.3 Endereço: Rua Botucatu, 740 – São Paulo – SP
7.4 CEP:04023-900
7.5 Telefone:

(4)

7.1 Nome: JOSE EDUARDO KRIEGER
7.2 Qualificação: Pesquisador
7.3 Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 44– São Paulo – SP
7.4 CEP: 05003-000
7.5 Telefone:

MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I, MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, USO DO REFERIDO MARCADOR MOLECULAR, MÉTODO ANALÍTICO PARA 5 DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIAS E KIT PARA USO NO DIAGNÓSTICO.

Campo da Invenção

A presente invenção trata de um método de identificação 10 e quantificação de proteínas, isoformas da enzima conversora de angiotensina I, especificamente ECAs de 190-kDa, especialmente de 90 kDa (marcador genético de hipertensão) e de 65kDa em tecidos, células e fluidos biológicos, especialmente na urina, um marcador molecular a base das 15 referidas proteínas, uso do referido marcador molecular, método analíticos para diagnóstico, estratificação de risco, decisão terapêutica em portadores de hipertensão arterial e lesões renais primárias ou secundária e kit para uso no diagnóstico, estratificação de risco e decisão terapêutica 20 na hipertensão arterial.

Antecedentes da Invenção

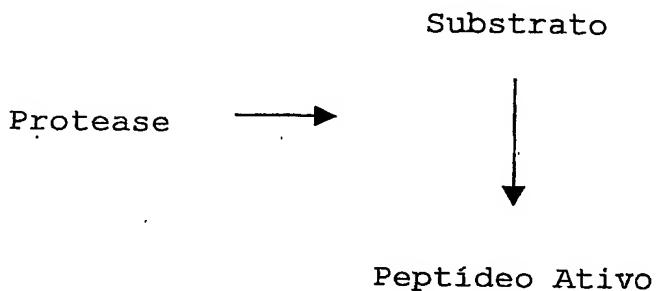
O conhecimento da existência de dois sistemas de polipeptídeos vasoativos, um hipertensor e outro hipotensor, no organismo de mamíferos é relativamente recente. As bases 25 fundamentais para a compreensão do sistema hipertensor, sistema renina-angiotensina, foram estabelecidas pelos trabalhos de Houssay e Fasciolo (1937), Houssay e Taquini (1938), Braun-Menendez, Fasciolo, Leloir e Muñoz (1939) e Kohlstaedt, Helmer e Page (1938). Por sua vez, o 30 conhecimento do sistema hipotensor, sistema calicreinas-

10

cininas, fundamenta-se nos trabalhos de Frey, Kraut e Werle, realizados na década de 1930 (Frey, Kraut e Schultz, 1930; Kraut e cols., 1930; Werle, 1936; Werle e cols., 1937) e naqueles de Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949) e

5 Prado, Beraldo e Rocha e Silva (1950).

Nos dois sistemas o peptídeo vasoativo é liberado de seu precursor protéico plasmático através de proteólise limitada segundo um esquema geral:



10 Os inúmeros trabalhos sobre purificação e caracterização das proteases e dos substratos envolvidos nestes dois sistemas permitiram o esclarecimento das várias etapas necessárias para a liberação do peptídeo ativo. O papel fisiológico destes últimos, contudo, ainda não está totalmente esclarecido, bem como o seu catabolismo.

15 SISTEMA RENINA - ANGIOTENSINA:

A renina é uma protease ácida (E. C. 3. 4. 99. 19), secretada e armazenada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes do glomérulo renal (Kohlstaedt e cols., 1938; Hartroft, 1963 e Tobian, 1960). O substrato sobre o qual esta enzima exerce sua ação é uma α_2 -globulina plasmática, angiotensinogênio, do qual se conhece parte da seqüência N-terminal (Braun - Menendez e cols., 1939; Bumpus e cols., 1958; Schwyzer e Turrian, 1960) que corresponde a

: Asp³ - Arg² - Val³ - Tyr⁴ - Ile⁵ - His⁶ - Pro⁷ - Phe⁸ - His⁹
 - Leu¹⁰ - Leu¹¹ - Val¹² - Tyr¹³ - Ser¹⁴.

A renina hidrolisando a ligação Leu¹⁰-Leu¹¹ na molécula do angiotensinogênio libera o decapeptídeo angiotensina I, que é pouco potente como vasoconstritor. Uma segunda enzima descrita por Skeggs e cols. (1956), a enzima conversora, é a responsável pela hidrólise da ligação Phe⁸ -His⁹ e pela liberação do octapeptídeo angiotensina II, farmacologicamente ativo, sendo inativado por angiotensinases. Toda esta seqüência de reações encontra-se esquematizada na figura 1.

O SISTEMA CALICREÍNAS - CININAS:

O sistema calicreína-cininas compreende cininogenases que hidrolisam um precursor inativo, o cininogênio, liberando cininas, que por sua vez são inativadas por cininases (figura 2).

O termo cininogenase inclui proteases, tais como: calicreínas, tripsina, pepsina, certas proteases bacterianas e venenos de cobra (Prado, 1970; Rocha e Silva e cols., 1949; Suzuki e Iwanaga, 1970). Entre estas enzimas, as calicreínas são específicas para o sistema: são serino-proteases que liberam cininas do cininogênio por proteólise limitada (Neurath, 1975) e tem pequena atividade proteolítica sobre outras proteínas. Dois tipos de calicreínas são encontradas nos mamíferos: glandular e plasmática, que diferem entre si em propriedades físico-químicas e imunológicas, velocidade de reação com cininogênicos e substratos sintéticos, tipos de cininas liberadas e resposta a uma variedade de inibidores sintéticos e naturais.

Os cininogênicos, por sua vez, são glicoproteínas ácidas que contém a molécula de bradicinina na extremidade C-terminal ou próximo a ela (Pierce, 1968); são hidrolisadas

pelas calicreínas glandulares liberando lisil - bradicinina, e pela plasmática liberando bradicinina (Rocha e Silva, 1974). A lisil - bradicinina é convertida em bradicinina por aminopeptidases existentes no plasma (Erdös e Yang, 1970) e 5 em tecidos (Hopsu e cols., 1966 a, b; Borges e cols., 1974; Prado e cols., 1975).

No plasma foram descritos, dois cininogênios funcionalmente distintos, cininogênio de alto peso molecular, que é substrato para as duas classes de calicreínas (plasmática e glandular), e cininogênio de baixo peso molecular, que é bom substrato somente para calicreínas glandulares (Werle e Trautschold, 1963; Prado e cols., 1971).

A bradicinina ($BK^b = Arg^1 - Pro^2 - Pro^3 - Gly^4 - Phe^5 - Ser^6 - Pro^7 - Phe^8 - Arg^9$), a lisil - bradicinina e a metionil - lisil - bradicinina são potentes agentes fisi-farmacopatológicos, produzindo hipotensão e vasodilatação, dor, contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos (Erdös e Yang, 1970; Pisano, 1975).

PAPEL FISIOLÓGICO DAS CININAS:

A ação das cininas no organismo ainda não está suficientemente esclarecida, embora a elas venha sendo atribuída participação em várias funções fisiológicas, quer 25 a nível sistêmico, quer à nível tissular.

Propõe - se sua mediação em processos tão variados como: vasodilatação periférica e mediação em fenômenos inflamatórios; interação com o sistema de síntese e liberação de prostaglandinas; mobilidade de espermatozoides; 30 regulação do fluxo renal; mediação na reabsorção de sódio pelo néfron (Wilhelm, 1973; Terragno e cols., 1975;

Baumgarten e cols., 1970; Schill e Haberland, 1974;
Levinsky, 1979).

Para o esclarecimento real do papel exercido pelas cininas neste conjunto de processos é importante o 5 conhecimento não só dos mecanismos que levam à sua liberação, como também do seu catabolismo.

CATABOLISMO DAS CININAS:

As enzimas responsáveis pela inativação das cininas são denominadas genericamente cininases. Sob esta sigla está 10 englobada uma série de peptidases capazes de hidrolisar ligações na molécula de BK ou de derivados, não sendo necessária ou comprovadamente participantes do catabolismo de cininas.

Observações sobre a existência desta classe de enzimas 15 vem sendo feitas desde os trabalhos iniciais do sistema das cininas e tem sido descritas em vários órgãos, tecidos e líquidos fisiológicos por diversos grupos de pesquisadores.

PLASMA:

No plasma humano já foram bem caracterizados dois tipos 20 de cininases; a cininase I (arginina carboxipeptidase, E.C. 3.4.12.7) e a cininase II (peptidil - dipeptidase, E.C. 3.4.15.1).

A cininase I é uma enzima do tipo carboxipeptidase, purificada pela primeira vez à partir da fração IV de Cohn 25 (Erdös e Sloane, 1962). Esta enzima hidrolisa a ligação Phe⁸ - Arg⁹ da BK. Foi denominada inicialmente carboxipeptidase N por possuir propriedades que a diferenciam da carboxipeptidase B pancreática. Apesar do nome oficial, arginina carboxipeptidase, esta enzima catalisa melhor a

hidrólise de lisina C - terminal do que arginina, em muitos substratos (Oshima e cols., 1975). 14

Entre os substratos sintéticos utilizados nos estudos de purificação e especificidade dessa enzima encontra-se HLA 5 (Oshima e cols., 1975).

A segunda enzima com atividade cininásica, descrita no plasma, é a cininase II, a qual inativa BK por hidrólise da ligação Pro⁷ - Phe⁸, liberando o dipeptídeo Phe-Arg (Yang e Erdös, 1967).

Verificou-se posteriormente, que esta enzima era idêntica a enzima conversora de angiotensina I (AI) do sistema renina - angiotensina (Yang e cols., 1970^a e Yang e cols., 1970 b), sendo, portanto, responsável pela hidrólise da ligação Phe⁸ - His⁹ na molécula da AI. Uma das 15 características desta enzima é ser inibida pelos peptídeos potenciadores de BK (BPP), descritos por Ferreira, (1965) e Ferreira (1966).

Enzimas com especificidades semelhantes àquelas das cininases I e II de plasma humano foram descritas em outras 20 espécies animais (Erdös e Yang, 1970).

PULMÃO:

Ao pulmão tem sido atribuída grande importância na destruição de BK, existindo uma série de trabalhos na literatura que relatam a inativação por este órgão, de alta 25 porcentagem de BK infundida. (Ferreira e Vane, 1967; Biron, 1968 e Dorer e cols., 1974).

Já foi purificada uma cininase II em pulmão de porco (Dorer e cols., 1972 e Nakajima e cols., 1973), pulmão de coelho e rato (Soffer e cols., 1974 e Lanzillo e Fanburg, (30 1974).

Estudos de Ryan e cols., tem contribuído bastante para esclarecer o mecanismo de inativação deste órgão. A BK seria

inativada, enquanto que AI seria convertida em AII durante a circulação, por uma enzima tipo cininase II que estava localizada nas vesículas pinocitóticas do endotélio vascular. Ryan e cols., verificaram ainda que a BK é muito mais facilmente hidrolisada que a LBK - BK e MLBK. Sua teoria é que estas cininas maiores tem acesso mais difícil às vesículas. Ryan e cols. postularam ainda que os produtos de hidrólise de BK encontrados após circulação pulmonar seriam decorrentes não só da ação da primeira enzima citada mas também à ação de outras enzimas localizadas no citoplasma de células endoteliais (Ryan e cols., 1968 e Ryan e cols., 1975).

FÍGADO:

Erdos e Yang atribuíram quase que exclusivamente às cininases plasmáticas e pulmonares a responsabilidade pelo catabolismo das cininas "in vivo ". Experiências de Prado e cols. (1975) demonstraram, entretanto, que outros órgãos são capazes de inativar cininas quando estas são perfundidas em ratos exangues, nos quais a circulação pulmonar foi excluída do circuito de perfusão. Neste mesmo trabalho, perfundindo fígado "in situ , mostraram que este órgão inativava quantidades consideráveis de BK.

Em continuação a estes trabalhos, Borges e cols. (1976) verificaram que a inativação de BK pelo fígado perfundido "in situ" é devida pelo menos a duas enzimas: uma peptidil dipeptide hidrolase e uma segunda enzima que hidrolisa a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK. Esta enzima poderia ser uma peptidase de membrana, pois foi removida do fígado perfundido através do uso de Triton X - 100 no líquido de perfusão. A atividade cininásica obtida nestes trabalhos é, segundo estes autores, bastante inferior àquela encontrada em sobrenadante de homogeneizado total do órgão.

Trabalhando exatamente com uma preparação deste tipo, ou seja, homogeneizado de fígado de rato, Mazzacoratti (1978) purificou duas serino - proteases com diferentes pesos moleculares, que hidrolisam a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK.

CÉREBRO

Muitos investigadores têm estudado o metabolismo de cininas em extratos de cérebro (Iwata e cols., 1969; Camargo e cols., 1969).

As cininases de homogeneizados de cérebro de coelho têm sido estudadas sistematicamente por Camargo e cols. (1973), Oliveira e cols. (1976). Duas tiol - endopeptidases com pH ótimo de 7,5 foram purificadas da fração sobrenadante. A primeira enzima, cininase A, hidrolisa a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK e tem um peso molecular de 71 kDa; enquanto a outra, cininase B, hidrolisa Pro⁷ - Phe⁸ como a cininase II, mas tem um peso molecular de 6900. Esta enzima seria diferente da enzima conversora (cininase II), pois estudos preliminares não mostraram conversão de AI em AII.

Wilk, Pierce e Orlowiski (1979) descreveram duas enzimas a partir de tecidos cerebrais que diferem das acima referidas. Uma das enzimas, extraída de pituitária bovina, também hidrolisa a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK, mas por seu peso molecular (maior que 100000) e por ser inibida por Na⁺ e K⁺ difere da cininase A. A segunda enzima descrita, extraída do cérebro de coelho, é específica para a hidrólise daquelas ligações peptídicas nas quais a prolina contribui com o grupamento carboxila. Esta enzima hidrolisa em primeiro lugar a ligação Pro⁷ - Phe⁸ da BK e em segundo a ligação Pro³ - Gly⁴.

RIM:

A atividade cininásica do rim é maior do que a encontrada no plasma ou no fígado (Erdös e Yang, 1970). 17

Neste órgão já foram purificadas várias enzimas com atividades cininásicas. Somente trabalhos de Erdos e cols., identificaram três enzimas diferentes no rim: uma, do tipo carboxipeptidase, que libera arginina C - terminal da BK, mas que difere em algumas propriedades da cininase I plasmática, motivo pelo qual foi denominada cininase p (Erdös e Yang, 1966); outra que hidrolisa a ligação Pro⁷ - Phe⁸ (Erdös e Yang, 1967), e uma terceira, caracterizada como imidopeptidase, que inativa BK por hidrólise da ligação Arg¹ - Pro² (Erdös e Yang, 1966).

Koida e Walter (1976) purificaram, a partir de rim de carneiro, uma enzima que hidrolisa ligações do tipo Pro - x na molécula de vários peptídeos, entre os quais a BK. Verificaram que o aminoácido x não pode ser prolina e que a catálise é mais rápida se x for um aminoácido lipofílico.

O catabolismo das cininas pelo rim tem sido estudado por métodos que visam a verificar os sítios de inativação deste peptídeo. Estes estudos indicam que, além da hidrólise de BK que ocorre a nível da rede vascular, parece ter bastante importância o catabolismo de cininas por enzimas situadas ao nível de células corticais renais (Erdös e Yang, 1967).

A atividade cininásica é muito baixa no glomérulo, mas uma cininase tipo II é encontrada em grande concentração na borda em escova do túbulo proximal (Holl e cols., 1976, Casarini e cols, 1997). Em concordância com este achado, Oparil e cols. (1976) verificaram que uma grande porcentagem de BK microinfundida é inativada no túbulo proximal. Como a geração de cinina no rim deve ocorrer na altura do túbulo contornado distal, aonde a calicreína é

sintetizada (Ørstavik e cols., 1976), parece lógico supor-se que a partir deste ponto outras cininases devem estar presentes no néfron ou no fluido intratubular.

URINA

5 Na urina humana Erdös e cols. (1978), caracterizam bem uma carboxipeptidase, que libera arginina C - terminal da BK, diferindo da plasmática quanto ao peso molecular, ação de inibidores e propriedades imunológicas. Apresenta contudo, similaridades cinéticas e de inibição com a enzima renal.

10 Em 1978, Ryan e cols. descreveram na urina três enzimas: uma que hidrolisa a ligação Pro⁷ - Phe⁸ da BK e converte AI em AII; outra, de massa molecular de 63 kDa, que rompe a ligação Phe⁸ - Arg⁹ da BK, não inibida por BPP
15 9a.

20 Figueiredo e cols. (1978) descreveram, ainda, uma cininase de massa molecular 250 kDa, inibida por agentes quelantes, que poderia ser semelhante à terceira entre as descritas por Ryan. Esta enzima hidrolisa arginina C - terminal, não hidrolisando, contudo, o substrato sintético HLA.

25 Excetuando o trabalho de Erdös e cols., 1978, que purificaram e caracterizaram uma carboxipeptidase de urina humana, em todos os outros trabalhos, porém, as enzimas descritas só foram parcialmente purificadas e/ou caracterizadas. Devido a esses dados conflitantes, a presente invenção tem como objetivo também caracterizar as diferentes atividades cininásicas ou seja da ECA em urina humana.

30 Uma forma de baixa massa molecular (BMM) da enzima conversora da angiotensina I de 91 kDa foi observada durante a preparação dessa enzima a partir de homogenato de

pulmão de rato [Lanzillo e cols., 1977]. Essa forma de BMM da ECA também foi observada em pulmão humano [Nishimura e cols., 1978], rim de porco [Nagamatsu e cols. 1980] e rim humano [Takada e cols., 1981]. Iwata e cols. (1983) e 5 Yotsumoto e cols. (1983) demonstraram que ECA BMM de 86 - 90 kDa pode ser obtida de pulmão de coelho e plasma humano, respectivamente, depois de tratamento com base. Na década de 90 Lantz e cols. (1991), descreveram três diferentes 10 isoformas da ECA com massas moleculares de 150 kDa, 80 kDa e 40 kDa caracterizadas fluido cerebrospinal humano. Todas as enzimas referidas anteriormente são semelhantes a somática. Casarini e cols., 1991, 1995, 2001, descreveram a 15 isoformas de 65 kDa e 90 kDa, ambas N-domínio na urina de pacientes hipertensos e de 65 kDa na urina de indivíduos normais. Deddish e cols. (1994) purificaram uma ECA com 108 kDa de massa molecular em fluido ileal, que também é 20 isoforma N-domain da ECA.

Na urina humana e de rato tem sido descrito a purificação de diversas isoformas da ECA [Ryan e cols., 1978; Kokubo e cols., 1978; Skidgel e cols., 1987; Casarini e cols., 1983, 1987]. Kokubu e cols. (1978) encontrou três 25 diferentes formas da ECA urina normal humana. Duas formas tinham alta massa molecular de >400 kDa e 290 kDa e uma terceira tinha massa molecular de 140 kDa. Ryan e cols. (1978) descreveram uma cininase II urina humana que foi separada em duas formas. A primeira co-cromatografava com ECA somática de 170 kDa, e a segunda era semelhante a uma proteína tendo uma massa molecular de 90 kDa. Casarini e cols. (1983, 1991, 1992, 1995, 2001) descreveram a ECA em 30 urina humana de indivíduos normais e pacientes hipertensos com massas moleculares de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa e também em urina de rato (Casarini e cols. 1987). Alves e cols., 1992 também descreveram isoformas de 170 kDa, 90 kDa e 65 kDa na urina de indivíduos normais e hipertensos. Costa e

cols., 1993, 2000 descreveram na urina de indivíduos normais ECAs com massas moleculares de 170 kDa, 65 kDa e 59 kDa, e na de hipertensos renovasculares enzimas com massas moleculares de 55 kDa, 57 kDa e 94 kDa. A atividade da ECA na urina não é derivada do plasma, mas do túbulo renal (Casarini e cols., 1997) e pode ser utilizada como um índice de dano renal tubular; uma vez que os níveis aumentam consideravelmente em doenças renais e infecções do trato urinário alto [Baggio e cols., 1981; Kato e cols., 1982].

Recentemente, também foi descrito duas isoformas de ECA no intracelular e no meio extracelular de células mesangiais em cultura com massas moleculares de 130 kDa e 65 kDa (Andrade e cols., 1998). Verificou-se ainda que na urina de crianças nascidas a termo é encontrada as isoformas de 190 kDa e 65 kDa e nas urina de crianças prematuras somente a isoforma da ECA de 65 kDa, sendo esta semelhante a porção N-domínio da mesma. Estudando a urina das crianças prematuras durante um período de 1 a 30 dias após o nascimento verificou-se que a isoforma de 190 kDa aparecia somente no trigésimo dia (Hattori e cols., 2000).

A Invenção :

Para a execução do método de identificação e quantificação de proteínas, isoformas da enzima conversora de angiotensina I, especificamente ECAs, de 190-kDa, especialmente 90 kDa e de 65 kDa em tecidos, células e fluidos biológicos, especialmente na urina da presente invenção, inicia -se pela coleta de fluidos como por exemplo urina, tecido ou células de organismos vivos submetendo -os a separação cromatográfica (resina AcA44 e/ou AcA 34; coluna de fase reversa C-18, em espectrômetro de massa) e por Western Blotting (utilizando anticorpo específico contra ECA

21

somática e contra ECA N-domínio [90 kDa, marcador genético de hipertensão e 65 kDa] das isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa. As isoformas de 190 kDa e 65 kDa se encontram presentes em indivíduos normais; enquanto que a isoforma de 90 kDa (marcador genético de hipertensão) caracterizará aqueles predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos (coração, sistema nervoso, vasculatura e rim).

O método da presente invenção parte do princípio de que uma alíquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos são processados e analisados por método de cromatografia líquida de alta performance com detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS) ou diretamente no detector de massa, onde a amostra em análise é comparada aos padrões previamente estabelecidos para as isoformas da ECA de 190 kDa, 90 kDa (marcador genético de hipertensão) e 65 kDa. Uma alíquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos serão processados e analisados por Western Blotting (ou outro método de imunoprecipitação) utilizando anticorpos específicos contra ECA de 190 kDa e as ECAs N-domínio (90 kDa, marcador genético de hipertensão e 65 kDa), utilizando como controles da análise as isoformas da ECA preparadas como padrões e a enzima recombinante da ECA.

As pesquisas para se chegar aos resultados propostos pela presente invenção, enfocando a ECA, iniciaram-se em 1983, quando foram analisados pacientes portadores de hipertensão arterial essencial (formas leve e/ou moderada) em uso agudo de captopril (50 a 150 mg) administrado oralmente em dose única diária. O estudo teve duração de 3 dias e, em cada dia, o período de coleta tinha duração de seis horas, sendo que eram coletadas amostras de sangue e urina no final do período basal (1 hora), após assumirem a posição supina, e ao término do estudo (após 6 horas). Os

resultados revelaram inibição de 50 % da atividade da enzima num período compreendido entre 1 e 2 horas após administração de captopril, retornando aos níveis basais ao término do estudo. A atividade enzimática utilizando o substrato Hipuril-His-Leu foi dosada pelo método de Friedland e Silverstein (1976). Na análise através de cromatografia de troca iônica da urina coletada após 6 horas, foram eluídos dois picos protéicos com atividade conversora de angiotensina I e inativadora de bradicinina nas condutividades de 0,7 mS (90 kDa) e 1,25 mS (65 kDa), diferindo do perfil encontrado em indivíduos normotensos com ECAs de 190 kDa e 65 kDa. Baseado nestas constatações, foram desenvolvidos estudos com um número maior de pacientes hipertensos essenciais leves, onde evidenciou-se a presença dos dois picos protéicos com atividade conversora de angiotensina I como citado acima (Casarini e cols., 1991).

Na continuidade do estudo referido acima (projeto com auxílio da FAPESP de no 95/9168-1) foram constituídos os seguintes grupos de estudo: pais normais/filhos normais; pais normais/filhos hipertensos; pais hipertensos/filhos hipertensos e pais hipertensos/filhos normais. Neste estudo, delineou-se que, no grupo (pais normais/filhos hipertensos) pais hipertensos/filhos hipertensos, a urina dos filhos apresentava as duas formas de 90 e 65 kDa; no grupo pais normais/filhos normais, a urina dos filhos apresentava as formas de 190 e 65 kDa; e, finalmente, no grupo pais hipertensos/filhos normais, a urina dos filhos apresentava as formas de 190, 90 e 65 kDa, sendo que estas duas últimas formas são fragmentos N-domínio.

Destes resultados, concluiu-se que possivelmente a forma de 90 kDa poderia vir a ser um marcador de hipertensão. No intuito de constatar se essa verificação era um fator genético ou um fator ligado ou não ao aumento da

pressão (físico), os dados foram validados nesse mesmo projeto no modelo experimental de rato. Para tal, foi estudado a urina dos ratos Wistar, Brown Norway, Lyon, SHR, 1R1C e DOCA-sal. Como resultado, os ratos Wistar, DOCA-sal, 5 1R1C e Brown Norway apresentavam as formas de 170 e 65 kDa; somente os ratos SHR, e SHR-SP apresentavam as formas 90 e 65 kDa. Estes resultados corroboraram com os obtidos em humanos, sendo, portanto, a isoforma de 90 kDa da ECA um marcador genético de hipertensão (Fapesp 97/00198-0, 10 Marques 1999).

Em 1997, os pesquisadores, da presente invenção, descreveram que a célula mesangial em cultura expressava RNAm da ECA (Casarini e cols., 1997). Esta enzima é detectada no intracelular (136 kDa e 65 kDa) e secretada (136 kDa e 65 kDa), indicando um efeito potencial da produção local de angiotensina II na função destas células (Fapesp 95/9168- 1; Andrade e cols., 1998).

Posteriormente foi verificado que o intracelular é meio de cultura das células mesangiais de SHR apresentavam o mesmo perfil das isoformas da ECA (90 e 65 kDa) encontrado na urina destes ratos, (Fapesp 99/01531-1), o que veio confirmar o resultado das pesquisas anteriores. À partir desses resultados foi verificado, pelos autores da presente invenção, que essas isoformas são expressas no pulmão, 20 adrenal, coração, aorta e fígado dos ratos Wistar (136 kDa e 69 kDa) e SHR (96 kDa e 69 kDa) não estando restritas ao rim (Ronchi, 2002); enfatizando que o marcador genético de hipertensão de 80/90/96 kDa é expresso nos vários tecidos e, com isso, levando a concluir que estas isoformas podem 25 contribuir para uma regulação órgão específica (cabe salientar que quando nos referimos às enzimas de 80 ou 96 ou 90 kDa, leia-se, mesmas enzimas com pequena alteração na glicolização).

A presente invenção inicia-se pela coleta de fluidos como por exemplo urina, tecido ou células de organismos vivos, que serão submetidos a separação cromatográfica (resina AcA44 e/ou AcA 34; coluna de fase reversa C-18, 5 **espectrômetro de massa**) e por Western Blotting (utilizando anticorpo específico contra ECA somática e contra ECA N-domínio [90 kDa, **marcador genético de hipertensão** e 65 kDa] das isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa. As isoformas de 190 kDa e 65 kDa estarão presentes em indivíduos normais 10 (ratos normais, células e/ou tecidos provenientes de ratos normais); enquanto que a isoforma de 90 kDa (**marcador genético de hipertensão**) caracterizará aqueles (indivíduos ou animais, etc) predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos 15 (coração, sistema nervoso, vasculatura e rim). Uma aliquote de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos serão processados e analisados por método de cromatografia líquida de alta performance com detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS) ou diretamente no 20 detector de massa, onde a amostra em análise é comparada aos padrões previamente estabelecidos para as isoformas da ECA de 190 kDa, 90 kDa (**marcador genético de hipertensão**) e 65 kDa. Uma aliquote de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos serão processados e 25 analisados por Western Blotting utilizando anticorpos específicos contra ECA de 190 kDa e as ECAs N-domínio (90 kDa, **marcador genético de hipertensão** e 65 kDa), utilizando como controles da análise as isoformas da ECA preparadas como padrões e a enzima recombinante da ECA.

30 ISOFORMA DA ECA COMO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO

ISOFORMA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (90 kDa, N-DOMÍNIO) COMO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO EXCRETADO NA URINA HUMANA.:

Com base nos estudos anteriores, os pesquisadores da
5 presente invenção detectaram em urina de indivíduos normotensos através de cromatografia de troca iônica, dois picos com atividade conversora de angiotensina I com massas moleculares de 190kDa e 65kDa. Quando processada a urina de pacientes hipertensos foi obtido um perfil onde foram eluídos dois picos com atividade conversora de angiotensina I nas com massas moleculares de 90 kDa e de 65 kDa, não sendo detectada a forma de 190 kDa (Hypertension 26:1145-1148, 1995).

Um dos objetivos da presente invenção consiste em
15 verificar o potencial da isoforma de 90 kDa como um marcador genético de hipertensão e como um prognóstico de hipertensão.

Foram estabelecidos os seguintes grupos de estudo :

- indivíduos normotensos com pais normotensos,
- normotensos com pais hipertensos ,
- hipertensos com pais normotensos, e
- hipertensos com pais hipertensos.

As urinas coletadas foram concentradas isoladamente e dialisadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e então submetidas a uma gel filtração em coluna AcA-34 equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, contendo NaCl 150 mM, pH 8,0. As frações coletadas (2 mL) foram monitoradas pela leitura de absorbância em 280 nm e pela atividade conversora de angiotensina I, utilizando Hipuril-L-His-L-Leu- e Z-Phe-His-Leu como substratos . Obtivemos os seguintes resultados: indivíduos normotensos com pais normotensos apresentaram duas isoformas com atividade da ECA (190 kDa e 65 kDa)

(n=21); indivíduos normotensos com pais hipertensos apresentaram três isoformas (190 kDa, 90 kDa e 65 kDa) (n=13) e indivíduos hipertensos com pais hipertensos apresentaram duas isoformas (90 kDa e 65 kDa) (n=13). Como prevíamos não encontramos ninguém que constituiria o grupo hipertensos com pais normotensos.

Dois indivíduos que apresentavam as isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa, com pressão normal e que permaneceram em contato com nosso grupo de pesquisa e foram acompanhados por 4 anos. No quarto ano pós detecção das isoformas na urina estes tornaram-se hipertensos, comprovando assim que a isoforma de 90 kDa realmente é um marcador genético de hipertensão.

CONCLUSÃO:

O fato da urina de indivíduos normotensos com pais hipertensos apresentarem as três isoformas da ECA com pesos moleculares de 190kDa, 90kDa e 65kDa, demonstra que a isoforma de 90 kDa que aparece precocemente, é um prognóstico de que esses indivíduos poderão vir a ter hipertensão, sendo portanto um marcador genético de hipertensão.

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA ISOFORMA DA ECA, MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E WESTERN BLOTTING

Western Blotting da urina humana fresca:

Urina foi coletada de uma única micção na presença de um "pool" (vários inibidores) de inibidores de proteases, concentrada e o correspondente a 100 ug foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% seguido de

Western Blotting com membrana PVDF, e incubação com o anticorpo policlonal Y1 contra ECA humana. Linha 1: urina de indivíduo normal, Linha 2: ECA recombinante selvagem, Linha 3: ECA recombinante secretada, Linha 4: urina de indivíduo hipertenso.

DOSAGEM POR ESPECTROMETRO DE MASSA:

Urina brura foi centrifugada por 10 minutos, 3000 rpm, a 4°C , seguida de concentração 4x em tuboUltrafree (Millipore), centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm, a 4°C, 10 diálise em centricon com tampão Tris/HCl 1mM, pH8,0 centrifugação por 5 minutos, 3000 rpm, a 4°C., obtendo -se urina concentrada e dialisada e a amostra assim preparada foi analisada em HPLC-MS.

Os solventes para o sistema de HPLC: solvente A consiste de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, Merck, Alemanha). As urinas serão separadas numa coluna de fase reversa Nova Pak C¹⁸ (Waters) 15 minutos num fluxo de 1.5 mL/min. As condições ainda estão sendo padronizados tentando melhorar a resolução do método.

20 ISOFORMA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (90 kDa)
COMO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO EXCRETADO EM URINA
RATO. PROTOCOLO DESENHADO PARA COMPROVAR OS ACHADOS
(AFIRMAÇÃO DE MARCADOR GENÉTICO PARA A PROTEÍNA DE 90 kDa)
COM URINA HUMANA.

25 Foram identificadas as isoformas da ECA presentes na urina de ratos isogênicos normotensos (WKY e Brown Norway), isogênicos hipertensos (SHR, SHR-SP, Lyon), isogênicos normotensos experimentalmente hipertensos (1K1C e DOCA-Sal) e isogênicos hipertensos tratados com antihipertensivos (SHR 30 + enalapril), com o intuito de comparar os perfis

cromatográficos obtidos entre si, buscando caracterizar a forma de 90 kDa como um marcador genético de hipertensão arterial.

A partir da urina de ratos WKY separamos por gel 5 filtração em resina de AcA-44 dois picos de atividade conversora de AI: o primeiro, WK-1, correspondendo à enzima de alta massa molecular (190 kDa) e o segundo, WK-2, correspondendo à enzima de baixa massa molecular (65 kDa), dados comprovados por Western Blotting. No grupo SRH, o 10 perfil cromatográfico apresentou-se diferente do encontrado no grupo anterior (WK), sendo identificadas uma ECA denominada S-1, com massa molecular de 80 kDa, e uma segunda, S-2, com massa molecular de 65 kDa, semelhante às encontradas na urina de pacientes hipertensos não tratados 15 de 90 kDa e 65 kDa (Casarini et al., 1991). As diferenças de massa molecular entre a enzima de 80 kDa da urina de rato e a enzima de 90 kDa da urina de humano ocorre devida à glicolisação (dados não mostrados).

No terceiro grupo (1K1C), um modelo de hipertensão renovascular induzida, o perfil cromatográfico foi semelhante ao encontrado nos ratos controles (WKY). Neste grupo obtivemos dois picos de atividade conversora de AI: o primeiro, C-1, correspondendo à enzima de 190 kDa e o segundo, C-2, à de 65 kDa.

A partir da urina de ratos SHR-SP, separamos por gel 25 filtração em resina AcA-44 dois picos com atividade conversora de AI: o primeiro, denominado SP-1, correspondendo à enzima de 80 kDa e um segundo denominado SP-2, correspondendo à enzima de 65 kDa, semelhantes aos 30 encontrados na urina de ratos SHR e também encontrados na urina de pacientes hipertensos não tratados (Casarini et al., 1991, 1995).

Já os ratos SHR-tratados com enalapril, demonstraram que apesar de terem a pressão controlada, carregaram a isoforma de 80 kDa demonstrando que o perfil das isoformas está ligado ao fator genético.

5 No grupo dos ratos controle do modelo DOCA-Sal, nos quais não foi administrado o tratamento hipertensivo, o perfil cromatográfico foi semelhante ao encontrado para os ratos normotensos WK. Obtivemos dois picos com atividade conversora de AI: o primeiro CD-1, correspondendo à enzima
10 de 190 kDa, e o segundo CD-2, à de 65 kDa.

O modelo DOCA-Sal, com hipertensão induzida por administração de DOCA e salina, apresentou um perfil cromatográfico semelhante ao encontrado nos ratos controle DOCA-Sal e WK. Obtivemos dois picos com atividade conversora 15 de AI: o primeiro, D-1, correspondendo à ECA de 190 kDa, e o segundo, D-2, à ECA de 65 kDa. Este resultado nos mostra que realmente o aparecimento da forma de 80 kDa está ligado a um fator genético e não sendo consequência do aumento da pressão.

20 O resultado da gel filtração da urina de ratos normotensos Brown Norway foi semelhante aos perfis encontrados nas urinas dos ratos normotensos. Foram obtidos dois picos com atividade da ECA: BN-1, que corresponde à enzima de 190 kDa, e o segundo, BN-2, que corresponde à enzima de 65 kDa, indicando que cepas diferentes de normotensos apresentam mesmo perfil cromatográfico.

Comparando os perfis cromatográficos da urina dos ratos WK (controle normal), 1K1C (hipertensão experimental - Goldblatt), DOCA-Sal (controle), DOCA-Sal (hipertensão 30 experimental) e Brown Norway normotenso com a urina dos ratos SHR, Lyon e SHR-SP (geneticamente hipertensos), podemos afirmar que a diferença básica está na presença da isoforma de 80 kDa nas urinas dos ratos geneticamente

hipertensos. O fato de a isoforma de 80 kDa não aparecer nos ratos 1K1C e DOCA-Sal, cuja hipertensão é induzida (fator físico), reforça a hipótese da mesma estar ligada a um fator genético.

5 CONCLUSÃO:

Os resultados sugerem que, em ratos geneticamente predispostos à hipertensão, a forma de 80 kDa seria detectada ao invés da de 190 kDa, podendo, portanto, servir como um marcador genético precoce da hipertensão.

10 SEGREGAÇÃO DA ISOFORMA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (90 kDa, N-DOMÍNIO), MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO EM URINA RATO. PROTOCOLO DESENHADO PARA DEMONSTRAR O APARECIMENTO (SEGREGAÇÃO DO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO (PROTEÍNA DE 90 kDa) NA URINA DE RATOS. CRUZAMENTO DOS
15 RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) E BROWN NORWAY (BN).

Num projeto anterior caracterizamos as diferentes isoformas de baixo peso molecular na urina de rato nos diferentes modelos experimentais (Wistar-Kyoto, SHR, 1R1C, DOCA-sal controle, DOCA-sal, SHR-SP e Brown Norway).
20 Verificamos que a forma de 90 kDa somente aparece nos ratos SHR e SHR-SP, evidenciando um fator genético para o aparecimento dessa forma. Neste projeto, iremos verificar a transmissão gênica das isoformas de 190 kDa, 80 kDa e 65 kDa da enzima conversora de angiotensina I, analisando seu genótipo e fenótipo na urina de ratos gerados a partir de cruzamentos e retrocruzamentos entre as raças SHR e Brown Norway.

Desenho do cruzamento

Foram realizados cruzamentos entre ratos Brown Norway e SHR (BN x SHR), gerando um grupo de ratos heterozigotos chamados de F1SB01 a F1SB04; deste grupo foram escolhidos 5 dois animais (F1SB01 e F1SB03), machos para realização do retrocruzamento com rato SHR (fêmea). Para fenotipagem, a urina dos animais foi coletada e concentrada, sendo em seguida submetida à cromatografia em coluna de gel filtração AcA-34, equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M pH 8,0 , 10 contendo NaCl 0,15M. Frações de 2,0 ml foram eluídas sob um fluxo de 20 ml/h, sendo monitoradas pela medida da absorbância em A280 nm e pela atividade enzimática da ECA utilizando-se como substrato Z-Phe-His-Leu (ZPheHL).

RESULTADOS

15 Genitores: dois picos com atividade da ECA foram eluídos da urina de ratos BN submetidos a cromatografia em coluna AcA-44, BN-1 e BN-2, com massa molecular estimada de 190 kDa e 65 kDa, respectivamente. Já na urina de ratos SHR detectou-se dois picos com atividade conversora, porém, com 20 massa molecular estimada de 90 kDa e 65 kDa, respectivamente.

Em F1 foram gerados 39 animais, dos quais 100% foram fenotipados como heterozigotos para as três formas da enzima de 190, 90 e 65 kDa. A partir do retrocruzamento foram 25 gerados animais dos quais 85 % apresentaram as três isoformas da enzima (grupo NH) e 15 % apresentaram as formas de 90 e 65 kDa (grupo H).

CONCLUSÃO

32

Através dos resultados obtidos, podemos sugerir que a isoforma de 90 kDa (marcador genético de hipertensão arterial) continua presente nas gerações oriundas dos cruzamentos e retrocruzamentos.

EXPRESSÃO DO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO, ISOFORMA DE 90 kDa NOS TECIDOS (AORTA, ADRENAL, CORAÇÃO, FÍGADO, PULMÃO, RIM, PANCREAS) DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COMPARADOS AOS WISTAR E WISTAR ISOGÊNICO.

Em estudos anteriores de nosso laboratório foram detectadas em urina de ratos Wistar as isoformas de 190 e 65 kDa, perfil este, semelhante ao descrito para os indivíduos normotensos. Enquanto que, na urina de ratos SHR foram identificadas as isoformas de 80 e 65 kDa, fragmentos N-terminais da ECA, repetindo o perfil encontrado para indivíduos hipertensos leves.

Os homogenatos foram submetidos à cromatografia em gel filtração, tendo sido detectados dois picos com atividade sobre o substrato HHL nos diferentes tecidos de ratos W e WI, cujas massas moleculares de 137 e 69 kDa são semelhantes às relatadas para a urina de ratos W (Tabela 1). Os tecidos de ratos SHR também apresentaram dois picos de atividade cujas massas moleculares estimadas foram de 96 e 69 kDa, sendo que esse perfil correspondeu ao encontrado para as enzimas de urina dos mesmos ratos. A expressão protéica das isoformas de 137 e 69 kDa foi observada em todos os tecidos estudados, obtidos dos ratos Wistar e Wistar isogênico pela técnica de Western Blotting. Utilizando a mesma técnica, confirmamos a expressão das isoformas de 96 e 69 kDa para todos os tecidos dos ratos SHR (Tabela 1). Os resultados obtidos mostram a expressão das isoformas de 69 kDa (além

33

da isoforma de 137 kDa) nos tecidos de W e WI, bem como das isoformas de 96 e 69 kDa nos tecidos dos ratos SHR, nos levando a propor que a expressão das isoformas N-domínio, mais especificamente a isoforma de 96 kDa (marcador genético de hipertensão) não está restrita somente a urina e/ou rim, mas estas estão presente, localmente nos tecidos estudados.

EXPRESSÃO DO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO, ISOFORMA DE
90 kDa NAS CÉLULAS MESANGIAIS EM CULTURA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COMPARADOS AOS RATOS WISTAR

10 Os glomérulos foram isolados de ratos Wistar ou de SHR segundo o método de Greenspon e Krakomer (1950). Os ratos foram anestesiados com éter sulfúrico e submetidos a nefrectomia bilateral. Os rins foram decapsulados e realizou-se a macrodissecção cortical. O córtex foi separado da medula e em seguida, os fragmentos foram passados por uma seqüência de peneiras que diferiam no tamanho da abertura das malhas (60, 100 e 200 mesh). Os glomérulos foram coletados da superfície da terceira peneira e forçados a passar por uma agulha (25 x 7) com o objetivo de descapsular os glomérulos. Os glomérulos descapsulados foram contados utilizando em câmara de Newbauer e divididos (densidade de ~300 glomérulos/cm²) em garrafas de 25 cm² utilizando RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina (50 U/mL), HEPES (2.6 g) e glutamina 2mM.

15 As garrafas de cultura foram mantidas a CO₂ (5%), à 37° C. O meio foi trocado a cada 36 h. Aproximadamente após 3 semanas a cultura primária das células mesangiais foram tripsinizadas. As subculturas cresceram no mesmo meio. Este procedimento foi repetido até o terceiro subcultivo, quando

20 as células foram preparadas para os experimentos: Células mesangiais (CM) (3º subcultivo) foram incubadas por 20 horas

25

30

com RPMI sem soro fetal bovina e após, as CM e o meio foram coletados separadamente.

O meio coletado no 3º subcultivo foi concentrado em concentrador Amicon. O meio concentrado (2.0 mL) foi submetido a uma gel filtração em coluna AcA-44 (1.5 x 100.8 cm; volume 178.0 mL), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo NaCl 150 mM. Foram coletadas frações de 2.0 mL sob fluxo de 20 mL/h. A eluição foi realizada sob fluxo de 20 mL por hora. Foram coletadas frações de 2 mL, sendo que estas foram monitoradas por medidas de absorbância em 280 nm e a atividade enzimática quantificada, utilizando-se como substrato Hippuril-His-Leu (HHL).

As CM coletadas foram lisadas com 4mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-114 1% e PMFS 0,5 mM, através de agitação mecânica, por 1hora, a 4°C. Após esse período, o lisado celular foi centrifugado e o sobrenadante coletado e concentrado em concentrador Amicon, sob pressão de nitrogênio, a 3 kgf/cm². Posteriormente, 2mL foi submetido a cromatografia em gel filtração.

Os resultados obtidos para CM em cultura de ratos Wistar e SHR apresentaram o mesmo perfil cromatográfico obtido para a urina humana de indivíduos normais e de pacientes hipertensos moderados e também para a urina de ratos Wistar e SHR confirmado portanto que no rim, mais especificamente no glomérulo, produzem as diferentes isoformas já citadas (Tabela 2).

CONCLUSÃO FINAL:

Baseado no fato que a ECA de 90 kDa aparece apenas em pacientes hipertensos / CM de SHR/urina de ratos SHR, nós podemos sugerir que a mesma possa ter um papel importante e específico como um marcador genético de hipertensão.

34

Baseado nos estudos obtidos com os grupos pais e filhos vimos que as isoformas de 190, 90 e 65 kDa estão presentes nos indivíduos normais filhos de pais hipertensos evidenciando uma segregação dessa isoforma, podendo 5 caracteriza-la como um preditor de hipertensão. Esses dados foram confirmados no cruzamento e retrocruzamento de ratos Brown Norway e SHR.

FIGURA 1: Demonstra a Cromatografia de gel filtração em coluna Ac A-34 de urina humana.

10 Urina de indivíduos normotensos com pais hipertensos apresentam as três isoformas da ECA com pesos moleculares de 190kDa, 90kDa e 65kDa, demonstrando que a isoforma de 90 kDa aparece precocemente demonstrando ser um prognóstico de que esses indivíduos poderão vir a ter hipertensão, sendo 15 portanto um marcador genético de hipertensão.

FIGURA 2 : Apresentação da Seqüência N-terminal e C-terminal das isoformas da enzima conversora de angiotensina I de 90 kDa e 65 kDa.

FIGURA 3 : Western Blotting da urina humana fresca.

20 Linha 1: urina de indivíduo normal, Linha 2: ECA recombinante selvagem, Linha 3: ECA recombinante secretada, Linha 4: urina de indivíduo hipertenso.

FIGURA 4: Esquema da dosagem por espectrometro de massa

TABELA I : Sumarização dos grupos de estudo quanto à suas 25 frações de eluição e massas moleculares estimadas, evidenciando a ECA de 80 kDa como marcador genético de hipertensão.

Tabela II: Sumarização dos grupos em estudo quanto às massas moleculares determinadas.

Tabela III: Isoformas da ECA detectadas no extracelular e lisado celular de células mesangiais em cultura de ratos Wistar e SHR.

36

REFERÊNCIAS:

5 LANZILLO JJ, FANBURG BL. Low molecular weight angiotensin I-converting enzyme from rat lung. *Biochem Biophys Acta* 491: 339-344, 1977

10 NISHIMURA K, YOSHIDA N, HIWADA K, UEDA E, KOKUBU T. Properties of three, different forms of angiotensin I-converting enzyme from human lung. *Biochem Biophys Acta* 522: 229-237, 1978

15 NAGAMATSU A, INOKUCHI JI, SOIDA S. Two different forms of angiotensin I-converting enzyme from hog kidney. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 459-464, 1980

20 TAKADA Y, HIWATA K, KOKUBU T. Isolation and characterization of angiotensin converting enzyme from human kidney. *J Biochem* 90: 1309-1319, 1981

IWATA K, BLACHER R, SOFFER RL, LAI CHUNLAW. Rabbit pulmonary angiotensin-converting enzyme: the NH₂-terminal fragment with enzymatic activity and its formation from the native enzyme by NH₄OH treatment. *Arch Biochem Biophys* 227: 188-201, 1983

25 YOTSUMOTO H, LANZILLO JJ, FANBURG BL.. Generation of a 90000 molecular weight fragment from human plasma angiotensin I-converting enzyme by enzymatic or alkaline hydrolysis. *Biochem Biophys Acta* 749: 180-184, 1983

30 LANTZ I, NYBERG F, TERENIUS L. Molecular heterogeneity of angiotensin converting enzyme in human

cerebrospinal fluid. *Biochem Int* 23: 941-948,
1991

DEDDISH PA, WANG J, MICHEL B, MORRIS PW, DAVIDSON NO,
SKIDGEL RA, ERDOS EG. Naturally occurring active
N-domain of human angiotensin I-converting enzyme.
Proc Natl Acad Sci USA 91: 7807-7811, 1994

RYAN JW, OZA NB, MARTIN LC, PENA GA. Biochemistry,
Pathophysiology and Clinical aspects. Components of
the kallikrein-kinin system in urine, in *Kinin II*
(vol 10), edited by Fuji S, Moryia H, Suzuki T,
Plenum Press, New York, 1978, pp 313-323

KOKUBU T, KATO I, NISHIMURA K, HIWADA K, UEDA E.
Angiotensin I-converting enzyme in urine. *Clin Chim Acta* 89: 375-379, 1978

SKIDGEL RA, WEARE JA, ERDÖS EG. Purification and
characterization of human converting enzyme
(kininase II). *Peptides* 2: 145-152, 1987

CASARINI DE. Purificação e caracterização de duas
peptidases com atividade cininásica encontradas em
urina humana. Dissertação de Mestrado apresentada
à Universidade Federal de São Paulo, Escola
Paulista de Medicina, 1983.

CASARINI DE, RIBEIRO EB, SCHOR N, SIGULEM D. Study of
angiotensin I converting enzyme in isolated and
artificially perfused kidney. *Arq. Biol. Tecnol.* 30
(1): 58, 1987

CASARINI DE, ALVES KB, COSTA RH, PLAVINIC FL, MOREIRA
MEM, RODRIGUES CIS, MARSON O. (1991). Effect of
diuretic upon urinary levels of angiotensin
converting enzyme (ACE) of essencial mild
hypertensive patients (EPH). *Hypertension* 17 (3):
463.

CASARINI DE, ALVES KB, ARAUJO MS, STELLA RCR.
Endopeptidase and carboxipeptidase activities in

37

38

human urine which hydrolyze bradykinin. *Braz J Med Biol Res* 25: 219-229, 1992

5 CASARINI DE, CARMONA AK, PLAVINIK FL, JULIANO L, ZANELLA MT, RIBEIRO AB. Effects of Ca²⁺ channel blockers as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *Hypertension* 26 (6), parte II, 1145-1148, 1995.

10 CASARINI DE, PLAVINIK FL, ZANELLA MT, MARSON O, KRIEGÉR JE, HIRATA I Y, STELLA RCR. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin converting enzymes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33:75-85, 2001.

15 ALVES KB, CASARINI DE, COSTA RH, PLAVINIC FL, PORTELA JE and MARSON O. Angiotensin converting enzymes (ACE) from urine of treated and untreated essencial mild hipertensive patients (EHP) with diuretic: partial purification and characterization. *Agents and Actions* 38/III: 270-277, 1992. COSTA RH, CASARINI DE, PORTELA JE, PLAVINIK FL, ALVES KB, MARSON O Enzimas conversoras de angiotensina en orina de hipertensos renovasculares, no tratados con diureticos: purification y caracterization. *Revista Espanhola de Nefrologia* 23(S5): 14 -17, 1993.

20 COSTA RH, CASARINI DE, PLAVNIK FL, MARSON O, ALVES KB. Angiotensin converting I-enzymes from urine of untreated renovascular hypertensive and normal patients: purification and characterization. *Immunopharmacology* 46: 237-246, 2000.

30 BAGGIO B, FAVARO S, CANTARO S, BERTAZZO L, FUNZIO A, BORSATTI A. Increased urinary angiotensin

converting enzyme in patients with upper tract infection. *Clin Chim Acta* 109: 211-218, 1981

KATO I, TAKATA K, NISHIMURA K, HIWADA K, KOKUBU T.

Increased urinary excretion of angiotensin converting enzyme in patients with renal diseases.

J Clin Chem Clin Biochem 20: 473-476, 1982.

ANDRADE MCC, QUINTO BMR., CARMONA AK, RIBAS OS, BOIM MA,

SCHOR N, CASARINI DE. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzymes from mesangial cells in culture. *Journal of Hypertension* 16: 2063-2074, 1998.

HATTORI MA, DEL BEM G, CARMONA AK, CASARINI DE.

Angiotensin converting enzymes (high and low molecular weight) in urine of premature and full term infants.

Hypertension 35: 1284-1290, 2000.

40

REIVINDICAÇÕES

1. METODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM TECIDOS, CÉLULAS E FLUIDOS BIOLÓGICOS caracterizado pelas seguintes etapas:

- (a) coletar uma aliquota de fluidos biológicos fresco ou concentrado, células ou tecidos de organismos vivos e submetê-los a análise e separação por método de e por Western Blotting;
- (b) comparar a amostra em análise aos padrões previamente estabelecidos para os marcadores genéticos de hipertensão e 65 kDa.isoformas da ECA de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa. Uma aliquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada utilizando como controles da análise as isoformas da ECA preparadas como padrões e a enzima recombinante da ECA;
- (c) detectar a presença das isoformas de 190 kDa e 65 kDa em indivíduos normais e detectar a presença da isoforma de 90 kDa que caracterizará aqueles indivíduos predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos.

2. METODO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que a isoforma de 90 kDa detectada na etapa (c) é o marcador genético de hipertenção e o agente prognóstico de hipertensão.

3. METODO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que a separação cromatográfica da etapa (a) ser processada em resina AcA44 e/ou AcA 34; coluna de fase reversa C-18, espectrometro de massa e Western Blotting utilizando anticorpo específico contra ECA

41

somática e contra ECA N-domínio [90 kDa e 65 kDa] das isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa.

4. MÉTODO de acordo com a reivindicação 1 a 3 caracterizado pelo fato do fluido biológico ser urina.
5. 5. MÉTODO de acordo com as reivindicações 1 a 4 caracterizado pelo fato de serem detectados em urina de indivíduos normotensos dois picos com atividade conversora de angiotensina I com pesos moleculares de 190kDa e 65kDa.
10. 6. MÉTODO de acordo com as reivindicação 5 caracterizado pelo fato de se empregar cromatografia de troca iônica.
7. MÉTODO de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de serem detectados em urina de indivíduos hipertensos um perfil onde foram eluídos dois picos com atividade conversora de angiotensina I com pesos moleculares de 90 kDa e de 65 kDa e não sendo detectada a forma de 170 kDa.
20. 8. MÉTODO de identificação do potencial da isoforma da enzima conversora de angiotensina I de 90 kDa caracterizado pelas seguintes etapas:
 - (a) concentrar e dialisar urina dialisadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e então submetidas a gel filtração em coluna AcA-34 equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, contendo NaCl 150 mM, pH 8,0;
 25. (b) As frações coletar 2 mL das frações e monitorar pela leitura de absorbância em A 280nm e pela atividade conversora de angiotensina I, utilizando Hipuril-L-His-L-Leu- e Z-Phe-His-Leu como substratos;
 30. (c) observar a presença das isoformas com atividade da ECA (170 kDa e 65 kDa) (n=21), das isoformas (170

42

kDa, 90 kDa e 65 kDa) (n=13) e das isoformas (90 kDa e 65 kDa) (n=13).

9. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que as duas isoformas com atividade da ECA (170 kDa e 65 kDa) (n=21) detectadas na etapa (c) serem provenientes de indivíduos normotensos com pais normotensos.

5

10. METODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que as três isoformas (170 kDa, 90 kDa e 65 kDa) (n=13) detectadas na etapa (c) serem provenientes de indivíduos normotensos com pais hipertensos.

10

11. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que as duas isoformas (90 kDa e 65 kDa) (n=13) detectadas na etapa (c) serem provenientes de indivíduos hipertensos com pais hipertensos.

15

12. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de ser a isoforma de 90 kDa um marcador genético de hipertensão e um agente prognóstico de hipertensão.

20

13. MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS GENÉTICO obtido de acordo com as reivindicações de 1 a 12 caracterizado pelo fato de ser a base da isoforma de 90 kDa .

25

14. USO DO MARCADOR GENÉTICO obtido de acordo com as reivindicações de 1 a 12 caracterizado pelo fato de ser empregado como agente prognóstico de hipertensão.

30

15. USO do marcador genético obtido de acordo com as reivindicações 1 a 12 caracterizado pelo fato de ser no diagnóstico da predisposição ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos.

16. USO de acordo com a reivindicação 15 caracterizado pelo fado dos órgãos alvo serem o coração, sistema nervoso, vasculatura e rim.

5 17. MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIOS caracterizado pelo fato de detectar a presença das isoformas de 190 kDa e 65 kDa em indivíduos normais e detectar a presença da isoforma de 90 kDa que caracterizará aqueles indivíduos predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos.

10

15 18. MÉTODO de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que a isoforma de 90 kDa detectada na etapa é o marcador genético de hipertenção e o agente prognóstico de hipertenão.

19. MÉTODO de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato de que o fluido biológico ser urina.

20. KIT PARA DIAGNÓSTICO caracterizado por conter o marcador genético obtido de acordo com as reivindicações 1 a 12.

20 21. KIT PARA DIAGNÓSTICO caracterizado por conter o marcador genético e a gente prognóstico de hipertensão.

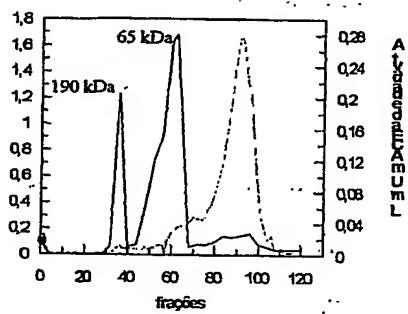
25 22. KIT de acordo com as reivindicações 16 e 17 caracterizado pelo fato de ser para uso no diagnóstico, estratificação de risco e decisão terapêutica na hipertensão arterial.

43

FIG. 01

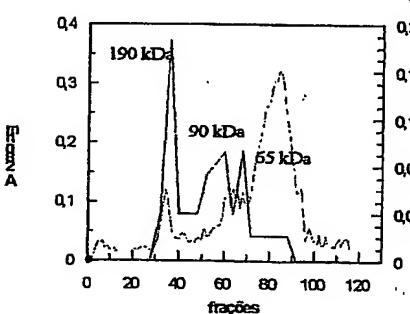
41

Filhos normotensos/ Pais normotensos



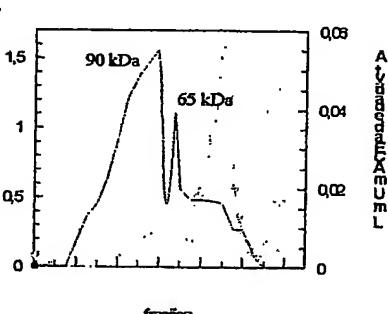
- A 280 nm
- Atividade da ECA sobre o substrato HHL

Filhos normotensos/ Pais hipertensos



- A 280 nm
- Atividade da ECA sobre o substrato HHL

Filhos hipertensos/ Pais hipertensos



- A 280 nm
- Atividade da ECA sobre o substrato HHL

FIG. 02

45

Seqüência N-terminal e C-terminal das isoformas da enzima conversora de angiotensina I de 90 kDa e 65 kDa

N-terminal:

	2	5	10	15
90 ACE	Asp Pro X	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser X	Asp Glu Ala Gly Ala Gln Leu	
Phe				
65 ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu X	Gly Ala Gln Leu	
Phe				
Somatic ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu Ala Gly Ala Gln Leu		
Phe				
Rat ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu Ala Gly Ala Gln Leu		
Phe				
Mouse ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Pro Asp Glu Ala Gly Ala Gln Leu		
Phe				
Bovine ACE	Asp Pro Ala	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Pro Ala Asp Glu Ala Gly Ala Gln Ile		
Phe				

C terminal:

65 kDa ACE:

GYLVDQXRXGVFS

Somática: GLLDRVTDNTESDINYLLKMALEKIAFLPFGYLVDQWRWGVFSGRTPPSRY

440 450 460 470 480

A enzima de 65 kDa termina no aminoácidos de número 481

90 kDa ACE

EVLGXPEYQXHPP

Somática: VGLDALDAQPLLKYFQPVTQWLQEQQNQNGEVLGWPEYQWHPLPDNYPE

590 600 610 620 630

A enzima de 90 kDa termina no aminoácido de número 632

FIG. 03

46

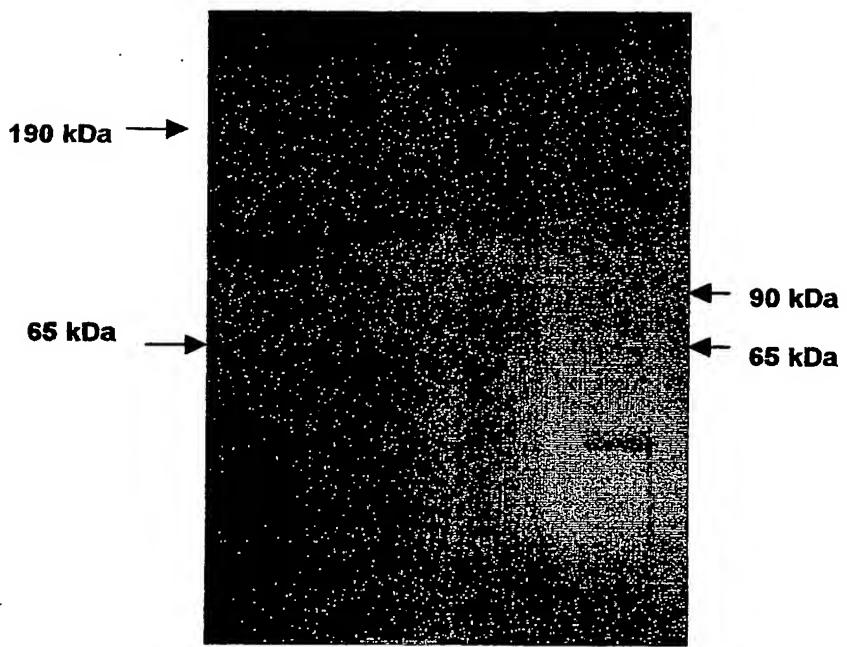
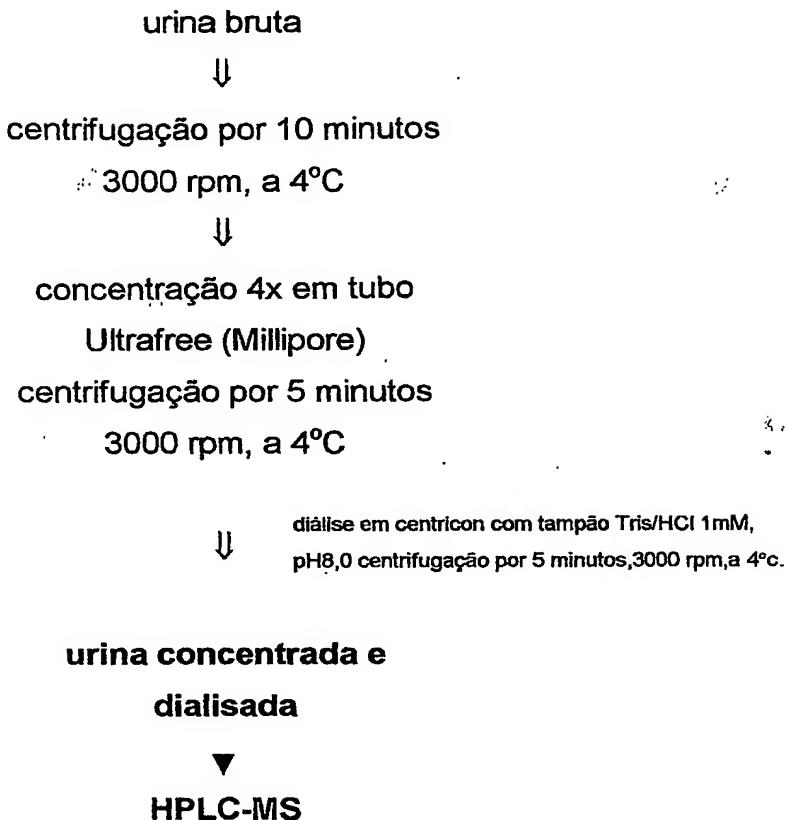


FIG. 04

47

DOSAGEM POR ESPECTROMETRO DE MASSA:

4B

TABELA I:

Linhagens	Enzimas	Eluição Fração (nº)	Massa Molecular Estimada (kDa)
WKY	WK-1	32	190
	WK-2	54	65
SHR	S-1	50	80
	S-2	55	65
1K1C	C-1	32	140
	C-2	54	65
DOCA-Sal	D-1	34	190
	D-2	52	65
DOCA-Sal controle	CD-1	34	190
	CD-2	52	65
SHR-SP	SP-1	50	90
	SP-2	55	65
BN	BN-1	32	190
	BN-2	54	65
SHR enalapril	S-1	50	80
	S-2	55	65
Lyon	L-1	50	80
	L-2	55	65

TABELA II:

40

Tecidos	Wistar	Wistar Isogênico	SHR
Adrenal	137	137	96
	69	69	69
Aorta	137	137	96
	69	69	69
Coração	137	137	96
	69	69	69
Fígado	137	137	96
	69	69	69
Pulmão	137	137	96
	69	69	69
Rim	137	137	96
	69	69	69
Testículo	137	137	96
	69	69	69

TABELA III:

Ratos	Extracelular	Intracelular
Wistar	130 kDa	135 kDa
	60 kDa	68 kDa
SHR	80 kDa	80 kDa
	60 kDa	68 kDa

RESUMO

MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I, MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, USO DO REFERIDO MARCADOR MOLECULAR, MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIAS E KIT PARA USO NO DIAGNÓSTICO.

A presente invenção trata de um método de identificação e quantificação de proteínas, isoformas da enzima conversora de angiotensina I especificamente ECA, 19-kDa, especialmente 90 kDa em tecidos, células e fluidos biológicos, especialmente na urina; marcador genético e agente prognóstico de hipertensão a base das referidas proteínas, uso do referido marcador e agente em portadores de hipertensão arterial e lesões renais primárias ou secundária e kit para uso no diagnóstico, estratificação de risco e decisão terapêutica na hipertensão arterial.

Um dos objetivos da presente invenção consiste em verificar o potencial da isoforma de 90 kDa como um marcador genético de hipertensão e como um prognóstico de hipertensão.

EXAME PRELIMINAR (PI-C-MU)

1. Petição de depósito: () 17.3432, de 12/07/02
2. Depositante UNIVERS. FED. DE SÃO PAULO - UNIFESP
2.1 Procurador: LLC Info Connection LTDA.
3. Natureza: API () C () M

4. Título (resumido):

5. Exigência: O pedido não atende formalmente as disposições legais, especialmente quando ao Art. 19 da LPI 127/97 e é recebido provisoriamente, ficando o requerente obrigado a sanar, em 30 (trinta) dias a contar da data da ciénc as exigencias estabelecidas abaixo. Não sendo a exigencia cumprida, com a apresentação da documentação exigida no prazo acima, o depósito não será aceito, e a documentação ficará à disposição do interessado, nos termos do Art. 21 da L

Oba. Se o depósito for efetuado por procurador, caso não seja apresentada procuração dentro do prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da data de depósito, o pedido será arquivado definitivamente.

Em 27.01.03

OLIVIA GATTOUS
Monica folt 32 440194
1981-06-04
(assinatura e carimbo)

	Data	Assinatura e nome legível
Enviado para a origem	23.1.03	Silvana
Recebido na origem	01.2.03	Kaupler
Cláusula do requerente		

ETAPA 1

PETIÇÃO, RELACIONADA COM PEDIDO, PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO:

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

53

1. Interessado:

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP

1.2 CGC/CPF (se houver): 60.453.032/0001-74

1.3 Endereço completo: Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino – São Paulo – SP
CEP: 05508-900

1.4 Telefone:

1.5 FAX:

(X) continua em folha anexa

2. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição:

"MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I, MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, USO DO REFERIDO MARCADOR MOLECULAR, MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIAS E KIT PARA USO NO DIAGNÓSTICO."

() continua em folha anexa

3. Natureza:

3.1 Invenção 3.1.1 Certificado de Adição 3.2. Modelo de Utilidade

4. Referência:

4.1 Pedido

4.2 Patente

4.3 Protocolo de depósito RJ/013432

4.4 Data: 20/12/2002

5. Procurador (74):

5.1 Nome e CPF/CGC: LLC - INFO CONNECTION LTDA - P. 00340
86.915.246/0001-09

5.2 Endereço completo: Rua Hermengarda, 60 / 403 – MÉIER – Rio – R.J.

5.3 Telefone: (021)3899-2002

5.4 FAX: (021)3899-2920

6. Apresenta/Requer:

Assinale o(s) itens que se aplica(m) ao seu caso:

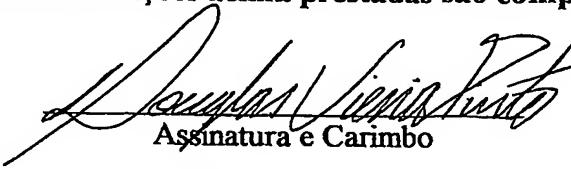
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

52

	O que se requer/apresenta	folhas
X	6.1 Modificações no Relatório Descritivo	32
X	6.2 Modificações nas Reivindicações	04
X	6.3 Modificações nos Desenhos	07
X	6.4 Modificações no Resumo	01
	6.5 Caducidade da Patente/Certificado de Adição	
	6.6 Contestação de Caducidade/Nulidade	
	6.7 Cópia oficial do pedido depositado.	
	6.8 Cumprimento ou Contestação de Exig. RPI , de	
	6.9 Desarquivamento, arquivado na RPI , de	
	6.1 Documentos de Prioridade	
	6.11 Exame do Pedido com reivindicações	
	6.12 Expedição de Carta Patente / Certificado de Adição	
	6.13 Guia(s) de Recolhimento (uma para cada serviço)	
	6.14 Manifestação s/ Parecer RPI , de	
	6.15 Nulidade da Patente / Certificado de Adição	
	6.16 Procuração	
	6.17 Publicação Antecipada	
	6.18 Recurso contra o Indeferimento	
	6.19 Recurso, (outros)	
	6.20 Renúncia da Patente	
	6.21 Restauração de acordo com o art. 87 da LPI.	
	6.22 Retirada do Pedido	
	6.23 Subsídios ao Exame Técnico	
	6.24 Oferta de Licença	
X	6.25 Outros (especificar): CUMPRIMENTO À EXIGÊNCIAS DO EXAME FORMAL PRELIMINAR E ESCLARECIMENTOS	02
X	6.26 Total de folhas anexadas	46

7. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2003.
Local e Data


Assinatura e Carimbo

LIC - INFO CONNECTION LTDA
Agente de Propriedade Industrial - 00340

FOLHA ANEXA

55

(2)

1. **Interessado: (Continuação)**
- 1.1 **Nome: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP**
- 1.2 **CGC/CPF (se houver): 43.828.151/0001-45**
- 1.4 **Endereço completo: Rua Pio XI, 1500 – Alto da Lapa – São Paulo – SP
CEP: 05468-901**
- 1.4 **Telefone: (11) 3838-4000**
- 1.5 **FAX:**

ESCLARECIMENTOS

56

REF.: Petição de depósito de pedido de patente RJ/013432 de 20/12/2002.

Sr(a). Examinador,

Pelo presente, tempestivamente e em atendimento às exigências formais formuladas em 22/01/2003 e conhecidas em 04/02/2003 para o pedido de patente de invenção depositado em 20/12/2002 através da petição RJ/013432, sob titularidade de UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP e FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP, estão sendo apresentados 5(cinco) cópias integrais do referido pedido com as alterações solicitadas no exame preliminar.

Esclarecemos, que a exigência formulada em relação a figura 03 da página 03/07 não tem como ser cumprida pois trata-se de reprodução fotográfica apresentada em níveis de cinza, conforme previsto no item 15.1.4.2 do NA 127/97.

Aguardando pelo acolhimento da presente e o pronto Deferimento do pedido.

Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2003.


Douglas Vieira Pinto
LLC INFO CONNECTION LTDA.
Agente de Propriedade Industrial

LLC - INFO CONNECTION LTDA
Agente de Propriedade Industrial - 00340

MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS,
 ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I, MARCADOR
 MOLECULAR GENÉTICO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, USO DO
 REFERIDO MARCADOR MOLECULAR, MÉTODO ANALÍTICO PARA
 5 DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM
 PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIAS E KIT
 PARA USO NO DIAGNÓSTICO.

57

Campo da Invenção

A presente invenção trata de um método de identificação
 10 e quantificação de proteínas, isoformas da enzima conversora
 de angiotensina I, especificamente ECAs de 190-kDa,
 especialmente de 90 kDa (marcador genético de hipertensão) e
 de 65kDa em tecidos, células e fluidos biológicos,
 especialmente na urina, um marcador molecular a base das
 15 referidas proteínas, uso do referido marcador molecular,
 método analíticos para diagnóstico, estratificação de risco,
 decisão terapêutica em portadores de hipertensão arterial e
 lesões renais primárias ou secundária e kit para uso no
 diagnóstico, estratificação de risco e decisão terapêutica
 20 na hipertensão arterial.

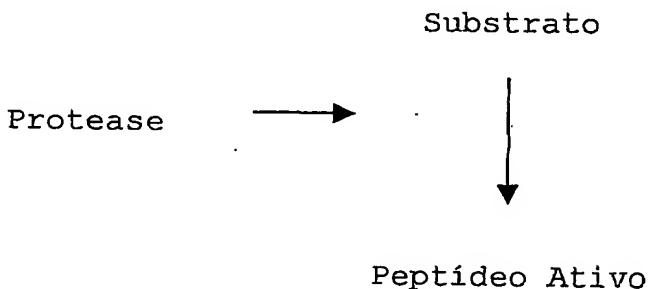
Antecedentes da Invenção

O conhecimento da existência de dois sistemas de
 polipeptídeos vasoativos, um hipertensor e outro hipotensor,
 no organismo de mamíferos é relativamente recente. As bases
 25 fundamentais para a compreensão do sistema hipertensor,
 sistema renina-angiotensina, foram estabelecidas pelos
 trabalhos de Houssay e Fasciolo (1937), Houssay e Taquini
 (1938), Braun-Menendez, Fasciolo, Leloir e Muñoz (1939) e
 Kohlstaedt, Helmer e Page (1938). Por sua vez, o
 30 conhecimento do sistema hipotensor, sistema calicreinas-

SB

cininas, fundamenta-se nos trabalhos de Frey, Kraut e Werle, realizados na década de 1930 (Frey, Kraut e Schultz, 1930; Kraut e cols., 1930; Werle, 1936; Werle e cols., 1937) e naqueles de Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949) e Prado, Beraldo e Rocha e Silva (1950).

Nos dois sistemas o peptídeo vasoativo é liberado de seu precursor protéico plasmático através de proteólise limitada segundo um esquema geral:



Os inúmeros trabalhos sobre purificação e caracterização das proteases e dos substratos envolvidos nestes dois sistemas permitiram o esclarecimento das várias etapas necessárias para a liberação do peptídeo ativo. O papel fisiológico destes últimos, contudo, ainda não está totalmente esclarecido, bem como o seu catabolismo.

15 SISTEMA RENINA - ANGIOTENSINA:

A renina é uma protease ácida (E. C. 3. 4. 99. 19), secretada e armazenada pelas células justaglomerulares das arteriolas aferentes do glomérulo renal (Kohlstaedt e cols., 1938; Hartroft, 1963 e Tobian, 1960). O substrato sobre o qual esta enzima exerce sua ação é uma α_2 -globulina plasmática, angiotensinogênio, do qual se conhece parte da seqüência N-terminal (Braun - Menendez e cols., 1939; Bumpus e cols., 1958; Schwyzer e Turrian, 1960) que corresponde a

: Asp³ - Arg² - Val³ - Tyr⁴ - Ile⁵ - His⁶ - Pro⁷ - Phe⁸ - His⁹
 - Leu¹⁰ - Leu¹¹ - Val¹² - Tyr¹³ - Ser¹⁴.

A renina hidrolisando a ligação Leu¹⁰-Leu¹¹ na molécula do angiotensinogênio libera o decapeptídeo angiotensina I,
 5 que é pouco potente como vasoconstritor. Uma segunda enzima descrita por Skeggs e cols. (1956), a enzima conversora, é a responsável pela hidrólise da ligação Phe⁸ -His⁹ e pela liberação do octapeptídeo angiotensina II, farmacologicamente ativo, sendo inativado por
 10 angiotensinases.

O SISTEMA CALICREÍNAS - CININAS:

O sistema calicreína-cininas compreende cininogenases que hidrolisam um precursor inativo, o cininogênio, liberando cininas, que por sua vez são inativadas por
 15 cininases.

O termo cininogenase inclui proteases, tais como: calicreínas, tripsina, pepsina, certas proteases bacterianas e venenos de cobra (Prado, 1970; Rocha e Silva e cols., 1949; Suzuki e Iwanaga, 1970). Entre estas enzimas, as
 20 calicreínas são específicas para o sistema: são serino - proteases que liberam cininas do cininogênio por proteólise limitada (Neurath, 1975) e tem pequena atividade proteolítica sobre outras proteínas. Dois tipos de calicreínas são encontradas nos mamíferos: glandular e
 25 plasmática, que diferem entre si em propriedades físico-químicas e imunológicas, velocidade de reação com cininogênicos e substratos sintéticos, tipos de cininas liberadas e resposta a uma variedade de inibidores sintéticos e naturais.

30 Os cininogênicos, por sua vez, são glicoproteínas ácidas que contém a molécula de bradicinina na extremidade C - terminal ou próximo a ela (Pierce, 1968); são hidrolisadas

pelas calicreínas glandulares liberando lisil - bradicinina, e pela plasmática liberando bradicinina (Rocha e Silva, 1974). A lisil - bradicinina é convertida em bradicinina por aminopeptidases existentes no plasma (Erdös e Yang, 1970) e 5 em tecidos (Hopsu e cols., 1966 a, b; Borges e cols., 1974; Prado e cols., 1975).

No plasma foram descritos, dois cininogênios funcionalmente distintos, cininogênio de alto peso molecular, que é substrato para as duas classes de calicreínas (plasmática e glandular), e cininogênio de baixo peso molecular, que é bom substrato somente para calicreínas glandulares (Werle e Trautschold, 1963; Prado e cols., 1971).

A bradicinina ($BK = Arg^1 - Pro^2 - Pro^3 - Gly^4 - Phe^5 - Ser^6 - Pro^7 - Phe^8 - Arg^9$), a lisil - bradicinina e a metionil - lisil - bradicinina são potentes agentes fisiocafarmacopatológicos, produzindo hipotensão e vasodilatação, dor, contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos (Erdös e Yang, 1970; Pisano, 1975).

PAPEL FISIOLÓGICO DAS CININAS:

A ação das cininas no organismo ainda não está suficientemente esclarecida, embora a elas venha sendo atribuída participação em várias funções fisiológicas, quer 25 a nível sistêmico, quer a nível tissular.

Propõe - se sua mediação em processos tão variados como: vasodilatação periférica e mediação em fenômenos inflamatórios; interação com o sistema de síntese e liberação de prostaglandinas; mobilidade de espermatozoides; 30 regulação do fluxo renal; mediação na reabsorção de sódio pelo néfron (Wilhelm, 1973; Terragno e cols., 1975;

61

Baumgarten e cols., 1970; Schill e Haberland, 1974;
Levinsky, 1979).

Para o esclarecimento real do papel exercido pelas cininas neste conjunto de processos é importante o 5 conhecimento não só dos mecanismos que levam à sua liberação, como também do seu catabolismo.

CATABOLISMO DAS CININAS:

As enzimas responsáveis pela inativação das cininas são denominadas genericamente cininases. Sob esta sigla está 10 englobada uma série de peptidases capazes de hidrolisar ligações na molécula de BK ou de derivados, não sendo necessária ou comprovadamente participantes do catabolismo de cininas.

Observações sobre a existência desta classe de enzimas 15 vem sendo feitas desde os trabalhos iniciais do sistema das cininas e tem sido descritas em vários órgãos, tecidos e líquidos fisiológicos por diversos grupos de pesquisadores.

PLASMA:

No plasma humano já foram bem caracterizados dois tipos 20 de cininases; a cininase I (arginina carboxipeptidase, E.C. 3.4.12.7) e a cininase II (peptidil - dipeptidase, E.C. 3.4.15.1).

A cininase I é uma enzima do tipo carboxipeptidase, purificada pela primeira vez a partir da fração IV de Cohn 25 (Erdös e Sloane, 1962). Esta enzima hidrolisa a ligação Phe⁸ - Arg⁹ da BK. Foi denominada inicialmente carboxipeptidase N por possuir propriedades que a diferenciam da carboxipeptidase B pancreática. Apesar do nome oficial, arginina carboxipeptidase, esta enzima catalisa melhor a

hidrólise de lisina C - terminal do que arginina, em muitos substratos (Oshima e cols., 1975).

62

Entre os substratos sintéticos utilizados nos estudos de purificação e especificidade dessa enzima encontra-se HLA 5 (Oshima e cols., 1975).

A segunda enzima com atividade cininásica, descrita no plasma, é a cininase II, a qual inativa BK por hidrólise da ligação Pro⁷ - Phe⁸, liberando o dipeptídeo Phe-Arg (Yang e Erdös, 1967).

Verificou-se posteriormente, que esta enzima era idêntica a enzima conversora de angiotensina I (AI) do sistema renina - angiotensina (Yang e cols., 1970^a e Yang e cols., 1970 b), sendo, portanto, responsável pela hidrólise da ligação Phe⁸ - His⁹ na molécula da AI. Uma das 15 características desta enzima é ser inibida pelos peptídeos potenciadores de BK (BPP), descritos por Ferreira, (1965) e Ferreira (1966).

Enzimas com especificidades semelhantes àquelas das cininases I e II de plasma humano foram descritas em outras 20 espécies animais (Erdös e Yang, 1970).

PULMÃO:

Ao pulmão tem sido atribuída grande importância na destruição de BK, existindo uma série de trabalhos na literatura que relatam a inativação por este órgão, de alta 25 porcentagem de BK infundida. (Ferreira e Vane, 1967; Biron, 1968 e Dorer e cols., 1974).

Já foi purificada uma cininase II em pulmão de porco (Dorer e cols., 1972 e Nakajima e cols., 1973), pulmão de coelho e rato (Soffer e cols., 1974 e Lanzillo e Fanburg, 30 (1974).

Estudos de Ryan e cols., tem contribuído bastante para esclarecer o mecanismo de inativação deste órgão. A BK seria

64

inativada, enquanto que AI seria convertida em AII durante a circulação, por uma enzima tipo cininase II que estava localizada nas vesículas pinocitóticas do endotélio vascular. Ryan e cols., verificaram ainda que a BK é muito mais facilmente hidrolisada que a LBK - BK e MLBK. Sua teoria é que estas cininas maiores tem acesso mais difícil às vesículas. Ryan e cols. postularam ainda que os produtos de hidrólise de BK encontrados após circulação pulmonar seriam decorrentes não só da ação da primeira enzima citada mas também à ação de outras enzimas localizadas no citoplasma de células endoteliais (Ryan e cols., 1968 e Ryan e cols., 1975).

FÍGADO:

Erdos e Yang atribuíram quase que exclusivamente às cininases plasmáticas e pulmonares a responsabilidade pelo catabolismo das cininas "in vivo ". Experiências de Prado e cols. (1975) demonstraram, entretanto, que outros órgãos são capazes de inativar cininas quando estas são perfundidas em ratos exangues, nos quais a circulação pulmonar foi excluída do circuito de perfusão. Neste mesmo trabalho, perfundindo fígado "in situ , mostraram que este órgão inativava quantidades consideráveis de BK.

Em continuação a estes trabalhos, Borges e cols. (1976) verificaram que a inativação de BK pelo fígado perfundido "in situ" é devida pelo menos a duas enzimas: uma peptidil dipeptidase hidrolase e uma segunda enzima que hidrolisa a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK. Esta enzima poderia ser uma peptidase de membrana, pois foi removida do fígado perfundido através do uso de Triton X - 100 no líquido de perfusão. A atividade cininásica obtida nestes trabalhos é, segundo estes autores, bastante inferior àquela encontrada em sobrenadante de homogeneizado total do órgão.

65

Trabalhando exatamente com uma preparação deste tipo, ou seja, homogeneizado de fígado de rato, Mazzacoratti (1978) purificou duas serino - proteases com diferentes pesos moleculares, que hidrolisam a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK.

CÉREBRO

Muitos investigadores têm estudado o metabolismo de cininas em extratos de cérebro (Iwata e cols., 1969; Camargo e cols., 1969).

As cininases de homogeneizados de cérebro de coelho têm sido estudadas sistematicamente por Camargo e cols. (1973), Oliveira e cols. (1976). Duas tiol - endopeptidases com pH ótimo de 7,5 foram purificadas da fração sobrenadante. A primeira enzima, cininase A, hidrolisa a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK e tem um peso molecular de 71 kDa; enquanto a outra, cininase B, hidrolisa Pro⁷ - Phe⁸ como a cininase II, mas tem um peso molecular de 6900. Esta enzima seria diferente da enzima conversora (cininase II), pois estudos preliminares não mostraram conversão de AI em AII.

Wilk, Pierce e Orlowiski (1979) descreveram duas enzimas a partir de tecidos cerebrais que diferem das acima referidas. Uma das enzimas, extraída de pituitária bovina, também hidrolisa a ligação Phe⁵ - Ser⁶ da BK, mas por seu peso molecular (maior que 100000) e por ser inibida por Na⁺ e K⁺ difere da cininase A. A segunda enzima descrita, extraída do cérebro de coelho, é específica para a hidrólise daquelas ligações peptídicas nas quais a prolina contribui com o grupamento carboxila. Esta enzima hidrolisa em primeiro lugar a ligação Pro⁷ - Phe⁸ da BK e em segundo a ligação Pro³ - Gly⁴.

RIM:

66

A atividade cininásica do rim é maior do que a encontrada no plasma ou no fígado (Erdös e Yang, 1970).

Neste órgão já foram purificadas várias enzimas com atividades cininásicas. Somente trabalhos de Erdos e cols., identificaram três enzimas diferentes no rim: uma, do tipo carboxipeptidase, que libera arginina C-terminal da BK, mas que difere em algumas propriedades da cininase I plasmática, motivo pelo qual foi denominada cininase p (Erdös e Yang, 1966); outra que hidrolisa a ligação Pro⁷ - Phe⁸ (Erdös e Yang, 1967), e uma terceira, caracterizada como imidopeptidase, que inativa BK por hidrólise da ligação Arg¹ - Pro² (Erdös e Yang, 1966).

Koida e Walter (1976) purificaram, a partir de rim de carneiro, uma enzima que hidrolisa ligações do tipo Pro - x na molécula de vários peptídeos, entre os quais a BK. Verificaram que o aminoácido x não pode ser prolina e que a catálise é mais rápida se x for um aminoácido lipofílico.

O catabolismo das cininas pelo rim tem sido estudado por métodos que visam a verificar os sítios de inativação deste peptídeo. Estes estudos indicam que, além da hidrólise de BK que ocorre a nível da rede vascular, parece ter bastante importância o catabolismo de cininas por enzimas situadas ao nível de células corticais renais (Erdös e Yang, 1967).

A atividade cininásica é muito baixa no glomérulo, mas uma cininase tipo II é encontrada em grande concentração na borda em escova do túbulo proximal (Holl e cols., 1976, Casarini e cols, 1997). Em concordância com este achado, Oparil e cols. (1976) verificaram que uma grande porcentagem de BK microinfundida é inativada no túbulo proximal. Como a geração de cinina no rim deve ocorrer na altura do túbulo contornado distal, aonde a calicreína é

sintetizada (Ørstavik e cols., 1976), parece lógico supor-se que a partir deste ponto outras cininases devem estar presentes no néfron ou no fluido intratubular.

URINA

Na urina humana Erdös e cols. (1978), caracterizam bem uma carboxipeptidase, que libera arginina C - terminal da BK, diferindo da plasmática quanto ao peso molecular, ação de inibidores e propriedades imunológicas. Apresenta contudo, similaridades cinéticas e de inibição com a enzima renal.

Em 1978, Ryan e cols. descreveram na urina três enzimas: uma que hidrolisa a ligação Pro⁷ - Phe⁸ da BK e converte AI em AII; outra, de massa molecular de 63 kDa, que rompe a ligação Phe⁸ - Arg⁹ da BK, não inibida por BPP.

9a.

Figueiredo e cols. (1978) descreveram, ainda, uma cininase de massa molecular 250 kDa, inibida por agentes quelantes, que poderia ser semelhante à terceira entre as descritas por Ryan. Esta enzima hidrolisa arginina C - terminal, não hidrolisando, contudo, o substrato sintético HLA.

Excetuando o trabalho de Erdös e cols., 1978, que purificaram e caracterizaram uma carboxipeptidase de urina humana, em todos os outros trabalhos, porém, as enzimas descritas só foram parcialmente purificadas e/ou caracterizadas. Devido a esses dados conflitantes, a presente invenção tem como objetivo também caracterizar as diferentes atividades cininásicas ou seja da ECA em urina humana.

Uma forma de baixa massa molecular (BMM) da enzima Conversora da angiotensina I de 91 kDa foi observada durante a preparação dessa enzima a partir de homogenato de

67

68

pulmão de rato [Lanzillo e cols., 1977]. Essa forma de BMM da ECA também foi observada em pulmão humano [Nishimura e cols., 1978], rim de porco [Nagamatsu e cols. 1980] e rim humano [Takada e cols., 1981]. Iwata e cols. (1983) e 5 Yotsumoto e cols. (1983) demonstraram que ECA BMM de 86 - 90 kDa pode ser obtida de pulmão de coelho e plasma humano, respectivamente, depois de tratamento com base. Na década de 90 Lantz e cols. (1991), descreveram três diferentes isoformas da ECA com massas moleculares de 150 kDa, 80 kDa 10 e 40 kDa caracterizadas fluido cerebrospinal humano. Todas as enzimas referidas anteriormente são semelhantes a somática. Casarini e cols., 1991, 1995, 2001, descreveram a isoformas de 65 kDa e 90 kDa, ambas N-domínio na urina de pacientes hipertensos e de 65 kDa na urina de indivíduos 15 normais. Dedish e cols. (1994) purificaram uma ECA com 108 kDa de massa molecular em fluido ileal, que também é isoforma N-domain da ECA.

Na urina humana e de rato tem sido descrito a purificação de diversas isoformas da ECA [Ryan e cols., 20 1978; Kokubo e cols., 1978; Skidgel e cols., 1987; Casarini e cols., 1983, 1987]. Kokubu e cols. (1978) encontrou treis diferentes formas da ECA urina normal humana. Duas formas tinham alta massa molecular de >400 kDa e 290 kDa e uma terceira tinha massa molecular de 140 kDa. Ryan e cols. 25 (1978) descreveram uma cininase II urina humana que foi separada em duas formas. A primeira co-cromatografava com ECA somática de 170 kDa, e a segunda era semelhante a uma proteína tendo uma massa molecular de 90 kDa. Casarini e cols. (1983, 1991, 1992, 1995, 2001) descreveram a ECA em 30 urina humana de indivíduos normais e pacientes hipertensos com massas moleculares de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa e também em urina de rato (Casarini e cols. 1987). Alves e cols., 1992 também descreveram isoformas de 170 kDa, 90 kDa e 65 kDa na urina de indivíduos normais e hipertensos. Costa e

cols., 1993, 2000 descreveram na urina de indivíduos normais ECAs com massas moleculares de 170 kDa, 65 kDa e 59 kDa, e na de hipertensos renovasculares enzimas com massas moleculares de 55 kDa, 57 kDa e 94 kDa. A atividade da ECA na urina não é derivada do plasma, mas do túbulo renal (Casarini e cols., 1997) e pode ser utilizada como um índice de dano renal tubular; uma vez que os níveis aumentam consideravelmente em doenças renais e infecções do trato urinário alto [Baggio e cols., 1981; Kato e cols., 1982].

Recentemente, também foi descrito duas isoformas de ECA no intracelular e no meio extracelular de células mesangiais em cultura com massas moleculares de 130 kDa e 65 kDa (Andrade e cols., 1998). Verificou-se ainda que na urina de crianças nascidas a termo é encontrada as isoformas de 190 kDa e 65 kDa e nas urina de crianças prematuras somente a isoforma da ECA de 65 kDa, sendo esta semelhante a porção N-domínio da mesma. Estudando a urina das crianças prematuras durante um período de 1 a 30 dias após o nascimento verificou-se que a isoforma de 190 kDa aparecia somente no trigésimo dia (Hattori e cols., 2000).

A Invenção :

Para a execução do método de identificação e quantificação de proteínas, isoformas da enzima conversora de angiotensina I, especificamente ECAs, de 190-kDa, especialmente 90 kDa e de 65 kDa em tecidos, células e fluidos biológicos, especialmente na urina da presente invenção, inicia-se pela coleta de fluidos como por exemplo urina, tecido ou células de organismos vivos submetendo-os a separação cromatográfica (resina AcA44 e/ou AcA 34; coluna de fase reversa C-18, em espectrômetro de massa) e por Western Blotting (utilizando anticorpo específico contra ECA

somática e contra ECA N-domínio [90 kDa, marcador genético de hipertensão e 65 kDa] das isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa. As isoformas de 190 kDa e 65 kDa se encontram presentes em indivíduos normais; enquanto que a isoforma de 90 kDa (marcador genético de hipertensão) caracterizará aqueles predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos (coração, sistema nervoso, vasculatura e rim).

70

O método da presente invenção parte do princípio de que uma alíquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos são processados e analisados por método de cromatografia líquida de alta performance com detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS) ou diretamente no detector de massa, onde a amostra em análise é comparada aos padrões previamente estabelecidos para as isoformas da ECA de 190 kDa, 90 kDa (marcador genético de hipertensão) e 65 kDa. Uma alíquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos serão processados e analisados por Western Blotting (ou outro método de imunoprecipitação) utilizando anticorpos específicos contra ECA de 190 kDa e as ECAs N-domínio (90 kDa, marcador genético de hipertensão e 65 kDa), utilizando como controles da análise as isoformas da ECA preparadas como padrões e a enzima recombinante da ECA

As pesquisas para se chegar aos resultados propostos pela presente invenção, enfocando a ECA, iniciaram-se em 1983, quando foram analisados pacientes portadores de hipertensão arterial essencial (formas leve e/ou moderada) em uso agudo de captopril (50 a 150 mg) administrado oralmente em dose única diária. O estudo teve duração de 3 dias e, em cada dia, o período de coleta tinha duração de seis horas, sendo que eram coletadas amostras de sangue e urina no final do período basal (1 hora), após assumirem a posição supina, e ao término do estudo (após 6 horas). Os

71

resultados revelaram inibição de 50 % da atividade da enzima num período compreendido entre 1 e 2 horas após administração de captopril, retornando aos níveis basais ao término do estudo. A atividade enzimática utilizando o substrato Hipuril-His-Leu foi dosada pelo método de Friedland e Silverstein (1976). Na análise através de cromatografia de troca iônica da urina coletada após 6 horas, foram eluídos dois picos protéicos com atividade conversora de angiotensina I e inativadora de bradicinina nas condutividades de 0,7 mS (90 kDa) e 1,25 mS (65 kDa), diferindo do perfil encontrado em indivíduos normotensos com ECAs de 190 kDa e 65 kDa. Baseado nestas constatações, foram desenvolvidos estudos com um número maior de pacientes hipertensos essenciais leves, onde evidenciou-se a presença dos dois picos protéicos com atividade conversora de angiotensina I como citado acima (Casarini e cols., 1991).

Na continuidade do estudo referido acima (projeto com auxílio da FAPESP de no 95/9168-1) foram constituídos os seguintes grupos de estudo: pais normais/filhos normais; pais normais/filhos hipertensos; pais hipertensos/filhos hipertensos e pais hipertensos/filhos normais. Neste estudo, delineou-se que, no grupo (pais normais/filhos hipertensos) pais hipertensos/filhos normais, a urina dos filhos apresentava as duas formas de 90 e 65 kDa; no grupo pais normais/filhos normais, a urina dos filhos apresentava as formas de 190 e 65 kDa; e, finalmente, no grupo pais hipertensos/filhos normais, a urina dos filhos apresentava as formas de 190, 90 e 65 kDa, sendo que estas duas últimas formas são fragmentos N-domínio.

Destes resultados, concluiu-se que possivelmente a forma de 90 kDa poderia vir a ser um marcador de hipertensão. No intuito de constatar se essa verificação era um fator genético ou um fator ligado ou não ao aumento da

pressão (físico), os dados foram validados nesse mesmo projeto no modelo experimental de rato. Para tal, foi estudado a urina dos ratos Wistar, Brown Norway, Lyon, SHR, 1R1C e DOCA-sal. Como resultado, os ratos Wistar, DOCA-sal, 1R1C e Brown Norway apresentavam as formas de 170 e 65 kDa; somente os ratos SHR, e SHR-SP apresentavam as formas 90 e 65 kDa. Estes resultados corroboraram com os obtidos em humanos, sendo, portanto, a isoforma de 90 kDa da ECA um marcador genético de hipertensão (Fapesp 97/00198-0, Marques 1999).

Em 1997, os pesquisadores, da presente invenção, descreveram que a célula mesangial em cultura expressava RNAm da ECA (Casarini e cols., 1997). Esta enzima é detectada no intracelular (136 kDa e 65 kDa) e secretada (136 kDa e 65 kDa), indicando um efeito potencial da produção local de angiotensina II na função destas células (Fapesp 95/9168- 1; Andrade e cols., 1998).

Posteriormente foi verificado que o intracelular e meio de cultura das células mesangiais de SHR apresentavam o mesmo perfil das isoformas da ECA (90 e 65 kDa) encontrado na urina destes ratos, (Fapesp 99/01531-1), o que veio confirmar o resultado das pesquisas anteriores. À partir desses resultados foi verificado, pelos autores da presente invenção, que essas isoformas são expressas no pulmão, adrenal, coração, aorta e fígado dos ratos Wistar (136 kDa e 69 kDa) e SHR (96 kDa e 69 kDa) não estando restritas ao rim (Ronchi, 2002); enfatizando que o marcador genético de hipertensão de 80/90/96 kDa é expresso nos vários tecidos e, com isso, levando a concluir que estas isoformas podem contribuir para uma regulação órgão específica (cabe salientar que quando nos referimos às enzimas de 80 ou 96 ou 90 kDa, leia-se, mesmas enzimas com pequena alteração na glicolização).

73

A presente invenção inicia-se pela coleta de fluidos como por exemplo urina, tecido ou células de organismos vivos, que serão submetidos a separação cromatográfica (resina AcA44 e/ou AcA 34; coluna de fase reversa C-18, 5 **espectrômetro de massa**) e por Western Blotting (utilizando anticorpo específico contra ECA somática e contra ECA N-domínio [90 kDa, **marcador genético de hipertensão** e 65 kDa] das isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa. As isoformas de 190 kDa e 65 kDa estarão presentes em indivíduos normais 10 (ratos normais, células e/ou tecidos provenientes de ratos normais); enquanto que a isoforma de 90 kDa (**marcador genético de hipertensão**) caracterizará aqueles. (indivíduos ou animais, etc) predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos 15 (coração, sistema nervoso, vasculatura e rim). Uma alíquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos serão processados e analisados por método de cromatografia líquida de alta performance com detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS) ou diretamente no detector de massa, onde a amostra em análise é comparada aos padrões previamente estabelecidos para as isoformas da ECA 20 de 190 kDa, 90 kDa (**marcador genético de hipertensão**) e 65 kDa. Uma alíquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada), células e tecidos serão processados e 25 analisados por Western Blotting utilizando anticorpos específicos contra ECA de 190 kDa e as ECAs N-domínio (90 kDa, **marcador genético de hipertensão** e 65 kDa), utilizando como controles da análise as isoformas da ECA preparadas como padrões e a enzima recombinante da ECA.

30 ISOFORMA DA ECA COMO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO

74

ISOFORMA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (90 kDa, N-DOMÍNIO) COMO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO EXCRETADO NA URINA HUMANA.:

Com base nos estudos anteriores, os pesquisadores da presente invenção detectaram em urina de indivíduos normotensos através de cromatografia de troca iônica, dois picos com atividade conversora de angiotensina I com massas moleculares de 190kDa e 65kDa. Quando processada a urina de pacientes hipertensos foi obtido um perfil onde foram eluídos dois picos com atividade conversora de angiotensina I nas com massas moleculares de 90 kDa e de 65 kDa, não sendo detectada a forma de 190 kDa (Hypertension 26:1145-1148, 1995).

Um dos objetivos da presente invenção consiste em verificar o potencial da isoforma de 90 kDa como um marcador genético de hipertensão e como um prognóstico de hipertensão.

Foram estabelecidos os seguintes grupos de estudo :

- indivíduos normotensos com pais normotensos,
- normotensos com pais hipertensos ,
- hipertensos com pais normotensos, e
- hipertensos com pais hipertensos.

As urinas coletadas foram concentradas isoladamente e dialisadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e então submetidas a uma gel filtração em coluna AcA-34 equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, contendo NaCl 150 mM, pH 8,0. As frações coletadas (2 mL) foram monitoradas pela leitura de absorbância em 280 nm e pela atividade conversora de angiotensina I, utilizando Hipuril-L-His-L-Leu- e Z-Phe-His-Leu como substratos . Obtivemos os seguintes resultados: indivíduos normotensos com pais normotensos apresentaram duas isoformas com atividade da ECA (190 kDa e 65 kDa)

75

(n=21); indivíduos normotensos com pais hipertensos apresentaram três isoformas (190 kDa, 90 kDa e 65 kDa) (n=13) e indivíduos hipertensos com pais hipertensos apresentaram duas isoformas (90 kDa e 65 kDa) (n=13). Como prevíamos não encontramos ninguém que constituiria o grupo hipertensos com pais normotensos.

Dois indivíduos que apresentavam as isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa, com pressão normal e que permaneceram em contato com nosso grupo de pesquisa e foram acompanhados por 4 anos. No quarto ano pós detecção das isoformas na urina estes tornaram-se hipertensos, comprovando assim que a isoforma de 90 kDa realmente é um marcador genético de hipertensão.

CONCLUSÃO:

O fato da urina de indivíduos normotensos com pais hipertensos apresentarem as três isoformas da ECA com pesos moleculares de 190kDa, 90kDa e 65kDa, demonstra que a isoforma de 90 kDa que aparece precocemente, é um prognóstico de que esses indivíduos poderão vir a ter hipertensão, sendo portanto um marcador genético de hipertensão.

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA ISOFORMA DA ECA, MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E WESTERN BLOTTING

Western Blotting da urina humana fresca:

Urina foi coletada de uma única micção na presença de um "pool" (vários inibidores) de inibidores de proteases, concentrada e o correspondente a 100 ug foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% seguido de

76

Western Blotting com membrana PVDF, e incubação com o anticorpo policlonal Y1 contra ECA humana. Linha 1: urina de indivíduo normal, Linha 2: ECA recombinante selvagem, Linha 3: ECA recombinante secretada, Linha 4: urina de indivíduo hipertenso.

DOSAGEM POR ESPECTROMETRO DE MASSA:

Urina brura foi centrifugada por 10 minutos, 3000 rpm, a 4°C, seguida de concentração 4x em tubo Ultrafree (Millipore), centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm, a 4°C, 10 diálise em centricon com tampão Tris/HCl 1mM, pH8,0 centrifugação por 5 minutos, 3000 rpm, a 4°C., obtendo -se urina concentrada e dialisada e a amostra assim preparada foi analisada em HPLC-MS.

Os solventes para o sistema de HPLC: solvente A consiste de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, Merck, Alemanha). As urinas serão separadas numa coluna de fase reversa Nova Pak C¹⁸ (Waters) 15 minutos num fluxo de 1.5 mL/min. As condições ainda estão sendo padronizados tentando melhorar a resolução do método.

20 ISOFORMA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (90 kDa)
COMO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO EXCRETADO EM URINA
RATO. PROTOCOLO DESENHADO PARA COMPROVAR OS ACHADOS
(AFIRMAÇÃO DE MARCADOR GENÉTICO PARA A PROTEÍNA DE 90 kDa)
COM URINA HUMANA.

25 Foram identificadas as isoformas da ECA presentes na urina de ratos isogênicos normotensos (WKY e Brown Norway), isogênicos hipertensos (SHR, SHR-SP, Lyon), isogênicos normotensos experimentalmente hipertensos (1K1C e DOCA-Sal) e isogênicos hipertensos tratados com antihipertensivos (SHR + enalapril), com o intuito de comparar os perfis

cromatográficos obtidos entre si, buscando caracterizar a forma de 90 kDa como um marcador genético de hipertensão arterial.

A partir da urina de ratos WKY separamos por gel 5 filtração em resina de AcA-44 dois picos de atividade conversora de AI: o primeiro, WK-1, correspondendo à enzima de alta massa molecular (190 kDa) e o segundo, WK-2, correspondendo à enzima de baixa massa molecular (65 kDa), dados comprovados por Western Blotting. No grupo SRH, o 10 perfil cromatográfico apresentou-se diferente do encontrado no grupo anterior (WK), sendo identificadas uma ECA denominada S-1, com massa molecular de 80 kDa, e uma segunda, S-2, com massa molecular de 65 kDa, semelhante às encontradas na urina de pacientes hipertensos não tratados 15 de 90 kDa e 65 kDa (Casarini et al., 1991). As diferenças de massa molecular entre a enzima de 80 kDa da urina de rato e a enzima de 90 kDa da urina de humano ocorre devida à glicolisação (dados não mostrados).

No terceiro grupo (1K1C), um modelo de hipertensão renovascular induzida, o perfil cromatográfico foi semelhante ao encontrado nos ratos controles (WKY). Neste grupo obtivemos dois picos de atividade conversora de AI: o primeiro, C-1, correspondendo à enzima de 190 kDa e o segundo, C-2, à de 65 kDa.

A partir da urina de ratos SHR-SP, separamos por gel filtração em resina AcA-44 dois picos com atividade conversora de AI: o primeiro, denominado SP-1, correspondendo à enzima de 80 kDa e um segundo denominado SP-2, correspondendo à enzima de 65 kDa, semelhantes aos encontrados na urina de ratos SHR e também encontrados na urina de pacientes hipertensos não tratados (Casarini et al., 1991, 1995).

Já os ratos SHR-tratados com enalapril, demonstraram que apesar de terem a pressão controlada, carregaram a isoforma de 80 kDa demonstrando que o perfil das isoformas está ligado ao fator genético.

5 No grupo dos ratos controle do modelo DOCA-Sal, nos quais não foi administrado o tratamento hipertensivo, o perfil cromatográfico foi semelhante ao encontrado para os ratos normotensos WK. Obtivemos dois picos com atividade conversora de AI: o primeiro CD-1, correspondendo à enzima de 190 kDa, e o segundo CD-2, à de 65 kDa.

O modelo DOCA-Sal, com hipertensão induzida por administração de DOCA e salina, apresentou um perfil cromatográfico semelhante ao encontrado nos ratos controle DOCA-Sal e WK. Obtivemos dois picos com atividade conversora de AI: o primeiro, D-1, correspondendo à ECA de 190 kDa, e o segundo, D-2, à ECA de 65 kDa. Este resultado nos mostra que realmente o aparecimento da forma de 80 kDa está ligado a um fator genético e não sendo consequência do aumento da pressão.

20 O resultado da gel filtração da urina de ratos normotensos Brown Norway foi semelhante aos perfis encontrados nas urinas dos ratos normotensos. Foram obtidos dois picos com atividade da ECA: BN-1, que corresponde à enzima de 190 kDa, e o segundo, BN-2, que corresponde à enzima de 65 kDa, indicando que cepas diferentes de normotensos apresentam mesmo perfil cromatográfico.

Comparando os perfis cromatográficos da urina dos ratos WK (controle normal), 1K1C (hipertensão experimental - Goldblatt), DOCA-Sal (controle), DOCA-Sal (hipertensão experimental) e Brown Norway normotenso com a urina dos ratos SHR, Lyon e SHR-SP (geneticamente hipertensos), podemos afirmar que a diferença básica está na presença da isoforma de 80 kDa nas urinas dos ratos geneticamente

hipertensos. O fato de a isoforma de 80 kDa não aparecer nos ratos 1K1C e DOCA-Sal, cuja hipertensão é induzida (fator físico), reforça a hipótese da mesma estar ligada a um fator genético.

79

5 CONCLUSÃO:

Os resultados sugerem que, em ratos geneticamente predispostos à hipertensão, a forma de 80 kDa seria detectada ao invés da de 190 kDa, podendo, portanto, servir como um marcador genético precoce da hipertensão.

10 SEGREGAÇÃO DA ISOFORMA DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (90 kDa, N-DOMÍNIO), MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO EM URINA RATO. PROTOCOLO DESENHADO PARA DEMONSTRAR O APARECIMENTO (SEGREGAÇÃO DO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO (PROTEÍNA DE 90 kDa) NA URINA DE RATOS. CRUZAMENTO DOS
 15 RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) E BROWN NORWAY (BN).

Num projeto anterior caracterizamos as diferentes isoformas de baixo peso molecular na urina de rato nos diferentes modelos experimentais (Wistar-Kyoto, SHR, 1R1C, DOCA-sal controle, DOCA-sal, SHR-SP e Brown Norway).
 20 Verificamos que a forma de 90 kDa somente aparece nos ratos SHR e SHR-SP, evidenciando um fator genético para o aparecimento dessa forma. Neste projeto, iremos verificar a transmissão gênica das isoformas de 190 kDa, 80 kDa e 65 kDa da enzima conversora de angiotensina I, analisando seu genótipo e fenótipo na urina de ratos gerados a partir de cruzamentos e retrocruzamentos entre as raças SHR e Brown Norway.

Desenho do cruzamento

BC

Foram realizados cruzamentos entre ratos Brown Norway e SHR (BN x SHR), gerando um grupo de ratos heterozigotos chamados de F1SB01 a F1SB04; deste grupo foram escolhidos 5 dois animais (F1SB01 e F1SB03), machos para realização do retrocruzamento com rato SHR (fêmea). Para fenotipagem, a urina dos animais foi coletada e concentrada, sendo em seguida submetida à cromatografia em coluna de gel filtração AcA-34, equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M pH 8,0, 10 contendo NaCl 0,15M. Frações de 2,0 ml foram eluídas sob um fluxo de 20 ml/h, sendo monitoradas pela medida da absorbância em A280 nm e pela atividade enzimática da ECA utilizando-se como substrato Z-Phe-His-Leu (ZPheHL).

RESULTADOS

15 Genitores: dois picos com atividade da ECA foram eluídos da urina de ratos BN submetidos a cromatografia em coluna AcA-44, BN-1 e BN-2, com massa molecular estimada de 190 kDa e 65 kDa, respectivamente. Já na urina de ratos SHR detectou-se dois picos com atividade conversora, porém, com 20 massa molecular estimada de 90 kDa e 65 kDa, respectivamente.

Em F1 foram gerados 39 animais, dos quais 100% foram fenotipados como heterozigotos para as três formas da enzima de 190, 90 e 65 kDa. A partir do retrocruzamento foram 25 gerados animais dos quais 85 % apresentaram as três isoformas da enzima (grupo NH) e 15 % apresentaram as formas de 90 e 65 kDa (grupo H).

CONCLUSÃO

81

Através dos resultados obtidos, podemos sugerir que a isoforma de 90 kDa (marcador genético de hipertensão arterial) continua presente nas gerações oriundas dos cruzamentos e retrocruzamentos.

EXPRESSÃO DO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO, ISOFORMA DE 90 kDa NOS TECIDOS (AORTA, ADRENAL, CORAÇÃO, FÍGADO, PULMÃO, RIM, PANCREAS) DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COMPARADOS AOS WISTAR E WISTAR ISOGÊNICO.

Em estudos anteriores de nosso laboratório foram detectadas em urina de ratos Wistar as isoformas de 190 e 65 kDa, perfil este, semelhante ao descrito para os indivíduos normotensos. Enquanto que, na urina de ratos SHR foram identificadas as isoformas de 80 e 65 kDa, fragmentos N-terminais da ECA, repetindo o perfil encontrado para indivíduos hipertensos leves.

Os homogenatos foram submetidos à cromatografia em gel filtração, tendo sido detectados dois picos com atividade sobre o substrato HHL nos diferentes tecidos de ratos W e WI, cujas massas moleculares de 137 e 69 kDa são semelhantes às relatadas para a urina de ratos W (Tabela 1). Os tecidos de ratos SHR também apresentaram dois picos de atividade cujas massas moleculares estimadas foram de 96 e 69 kDa, sendo que esse perfil correspondeu ao encontrado para as enzimas de urina dos mesmos ratos. A expressão protéica das isoformas de 137 e 69 kDa foi observada em todos os tecidos estudados, obtidos dos ratos Wistar e Wistar isogênico pela técnica de Western Blotting. Utilizando a mesma técnica, confirmamos a expressão das isoformas de 96 e 69 kDa para todos os tecidos dos ratos SHR (Tabela 1). Os resultados obtidos mostram a expressão das isoformas de 69 kDa (além da

82

isoforma de 137 kDa) nos tecidos de W e WI, bem como das isoformas de 96 e 69 kDa nos tecidos dos ratos SHR, nos levando a propor que a expressão das isoformas N-domínio, mais especificamente a isoforma de 96 kDa (marcador genético de hipertensão) não está restrita somente a urina e/ou rim, mas estas estão presentes, localmente nos tecidos estudados.

EXPRESSÃO DO MARCADOR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO, ISOFORMA DE 90 kDa NAS CÉLULAS MESANGIAIS EM CULTURA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS COMPARADOS AOS RATOS WISTAR

Os glomérulos foram isolados de ratos Wistar ou de SHR segundo o método de Greenspon e Krakomer (1950). Os ratos foram anestesiados com éter sulfúrico e submetidos à nefrectomia bilateral. Os rins foram decapsulados e realizou-se a macrodissecção cortical. O córtex foi separado da medula e em seguida, os fragmentos foram passados por uma seqüência de peneiras que diferiam no tamanho da abertura das malhas (60, 100 e 200 mesh). Os glomérulos foram coletados da superfície da terceira peneira e forçados a passar por uma agulha (25 x 7) com o objetivo de descapsular os glomérulos. Os glomérulos descapsulados foram contados utilizando em câmara de Newbauer e divididos (densidade de ~300 glomérulos/cm²) em garrafas de 25 cm² utilizando RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina (50 U/mL), HEPES (2.6 g) e glutamina 2mM. As garrafas de cultura foram mantidas a CO₂ (5%), à 37° C. O meio foi trocado a cada 36 h. Aproximadamente após 3 semanas a cultura primária das células mesangiais foram tripsinizadas. As subculturas cresceram no mesmo meio. Este procedimento foi repetido até o terceiro subcultivo, quando as células foram preparadas para os experimentos: Células mesangiais (CM) (3º subcultivo) foram incubadas por 20 horas

com RPMI sem soro fetal bovina e após, as CM e o meio foram coletados separadamente.

83

O meio coletado no 3º subcultivo foi concentrado em concentrador Amicon. O meio concentrado (2.0 mL) foi 5 submetido a uma gel filtração em coluna AcA-44 (1.5 x 100.8 cm; volume 178.0 mL), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo NaCl 150 mM. Foram coletadas frações de 2.0 mL sob fluxo de 20 mL/h. A eluição foi realizada sob fluxo de 20 mL por hora. Foram coletadas frações de 2 mL, sendo 10 que estas foram monitoradas por medidas de absorbância em 280 nm e a atividade enzimática quantificada, utilizando-se como substrato Hippuril-His-Leu (HHL).

As CM coletadas foram lisadas com 4mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-114 1% e PMFS 0,5 mM, 15 através de agitação mecânica, por 1hora, a 4°C. Após esse período, o lisado celular foi centrifugado e o sobrenadante coletado e concentrado em concentrador Amicon, sob pressão de nitrogênio, a 3 kgf/cm². Posteriormente, 2mL foi submetido a cromatografia em gel filtração.

Os resultados obtidos para CM em cultura de ratos Wistar e SHR apresentaram o mesmo perfil cromatográfico obtido para a urina humana de indivíduos normais e de pacientes hipertensos moderados e também para a urina de ratos Wistar e SHR confirmando portanto que no rim, mais 20 especificamente no glomérulo, produzem as diferentes isoformas já citadas (Tabela 2).

CONCLUSÃO FINAL:

Baseado no fato que a ECA de 90 kDa aparece apenas em pacientes hipertensos / CM de SHR/urina de ratos SHR, nós 30 podemos sugerir que a mesma possa ter um papel importante e específico como um marcador genético de hipertensão.

84

Baseado nos estudos obtidos com os grupos pais e filhos vimos que as isoformas de 190, 90 e 65 kDa estão presentes nos indivíduos normais filhos de pais hipertensos evidenciando uma segregação dessa isoforma, podendo 5 caracteriza-la como um preditor de hipertensão. Esses dados foram confirmados no cruzamento e retrocruzamento de ratos Brown Norway e SHR.

FIGURA 1 (A, B, C): Demonstra a Cromatografia de gel filtração em coluna Ac A-34 de urina humana.

FIGURA 1A: Filhos normotensos/Pais normotensos (A 280nm - Atividade da ECA sobre o substrato HHL).

FIGURA 1B: Filhos normotensos/Pais hipertensos (A 280nm - Atividade da ECA sobre o substrato HHL).

FIGURA 1C: Filhos hipertensos /Pais hipertensos (A 280nm - Atividade da ECA sobre o substrato HHL).

Urina de indivíduos normotensos com pais hipertensos apresentaram as três isoformas da ECA com pesos moleculares de 190kDa, 90kDa e 65kDa, demonstrando que a isoforma de 90 kDa aparece precocemente demonstrando ser um prognóstico de que esses indivíduos poderão vir a ter hipertensão, sendo portanto um marcador genético de hipertensão.

FIGURA 2: Apresentação da Seqüência N-terminal e C-terminal das isoformas da enzima conversora de angiotensina I de 90 kDa e 65 kDa. A enzima de 65 kDa termina no aminoácido de número 481. A enzima de 90 kDa termina no aminoácido de número 632.

B5

FIGURA 3: Western Blotting da urina humana fresca.

Linha 1: urina de indivíduo normal, Linha 2: ECA recombinante selvagem, Linha 3: ECA recombinante secretada, Linha 4: urina de indivíduo hipertenso.

5 FIGURA 4: Esquema da dosagem por espectrometro de massa.

O presente esquema apresenta 5 (cinco) etapas iniciando-se pela urina bruta que na segunda etapa é centrifugada por 10 minutos em uma velocidade de 3000 rpm a uma temperatura de 4° C. Na terceira etapa a urina é concentrada 4x (quatro vezes) em um tubo Ultrafree (Millipore) e é centrifugada por 5 (cinco) minutos a uma velocidade de 3000 rpm a uma temperatura de 4° C, passando para a quarta etapa onde a urina concentrada passa por uma diálise em centricon com tampão Tris/HCl 1 mM, pH 8,0 em centrifugação por 5 (cinco) minutos à uma velocidade de 3000 rpm a uma temperatura de 4° C, resultando uma urina concentrada e dialisada e por fim a quinta etapa resultando o HPLC-MS.

20 **TABELA I:** Sumarização dos grupos de estudo quanto à suas frações de eluição e massas moleculares estimadas, evidenciando a ECA de 80 kDa como marcador genético de hipertensão.

25 **Tabela II:** Sumarização dos grupos em estudo quanto às massas moleculares determinadas.

Tabela III: Isoformas da ECA detectadas no extracelular e lisado celular de células mesangiais em cultura de ratos Wistar e SHR.

REFERÊNCIAS:

30 LANZILLO JJ., FANBURG BL. Low molecular weight angiotensin I-converting enzyme from rat lung. *Biochem Biophys Acta* 491: 339-344, 1977

NISHIMURA K, YOSHIDA N, HIWADA K, UEDA E, KOKUBU T. Properties of three different forms of angiotensin

I-converting enzyme from human lung. *Biochem Biophys Acta* 522: 229-237, 1978

86

NAGAMATSU A, INOKUCHI JI, SOIDA S. Two different forms of angiotensin I-converting enzyme from hog kidney. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 459-464, 1980

5 TAKADA Y, HIWATA K, KOKUBU T. Isolation and characterization of angiotensin converting enzyme from human kidney. *J Biochem* 90: 1309-1319, 1981

10 IWATA K, BLACHER R, SOFFER RL, LAI CHUNLAW. Rabbit pulmonary angiotensin-converting enzyme: the NH₂-terminal fragment with enzymatic activity and its formation from the native enzyme by NH₄OH treatment. *Arch Biochem Biophys* 227: 188-201, 1983

15 YOTSUMOTO H, LANZILLO JJ, FANBURG BL. Generation of a 90000 molecular weight fragment from human plasma angiotensin I-converting enzyme by enzymatic or alkaline hydrolysis. *Biochem Biophys Acta* 749: 180-184, 1983

20 LANTZ I, NYBERG F, TERENIUS L. Molecular heterogeneity of angiotensin converting enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochem Int* 23: 941-948, 1991

25 DEDDISH PA, WANG J, MICHEL B, MORRIS PW, DAVIDSON NO, SKIDGEL RA, ERDOS EG. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7807-7811, 1994

RYAN JW, OZA NB, MARTIN LC, PENA GA. Biochemistry, Pathophysiology and Clinical aspects. Components of the kallikrein-kinin system in urine, in *Kinin II* (vol 10), edited by Fuji S, Moryia H, Suzuki T, Plenum Press, New York, 1978, pp 313-323

KOKUBU T, KATO I, NISHIMURA K, HIWADA K, UEDA E.
 Angiotensin I-converting enzyme in urine. *Clin Chim Acta* 89: 375-379, 1978

B7

SKIDGEL RA, WEARE JA, ERDÖS EG. Purification and
 5 characterization of human converting enzyme
 (kininase II). *Peptides* 2: 145-152, 1987

CASARINI DE." Purificação e caracterização de duas
 peptidases com atividade cininásica encontradas em
 urina humana. Dissertação de Mestrado apresentada
 à Universidade Federal de São Paulo, Escola
 Paulista de Medicina, 1983.

CASARINI DE, RIBEIRO EB, SCHOR N, SIGULEM D. Study of
 angiotensin I converting enzyme in isolated and
 artificially perfused kidney. *Arq. Biol. Tecnol.* 30
 15 (1): 58, 1987

CASARINI DE, ALVES KB, COSTA RH, PLAVINIC FL, MOREIRA
 MEM, RODRIGUES CIS, MARSON O. (1991). Effect of
 diuretic upon urinary levels of angiotensin
 converting enzyme (ACE) of essencial mild
 hypertensive patients (EPH). *Hypertension* 17 (3):
 463.

CASARINI DE, ALVES KB, ARAUJO MS, STELLA RCR.
 Endopeptidase and carboxipeptidase activities in
 human urine which hydrolyze bradykinin. *Braz J Med
 25. Biol Res* 25: 219-229, 1992

CASARINI DE, CARMONA AK, PLAVINIK FL, JULIANO L,
 ZANELLA MT, RIBEIRO AB. Effects of Ca²⁺ channel
 blockers as inhibitors of angiotensin I-converting
 enzyme. *Hypertension* 26 (6), parte II, 1145-1148,
 30 1995.

CASARINI DE, PLAVINIK FL, ZANELLA MT, MARSON O,
 KRIEGER JE, HIRATA I Y, STELLA RCR. Angiotensin
 converting enzymes from humanurine of mild
 hypertensive patients resemble the N-terminal

fragment of human angiotensin converting enzymes.
 International Journal of Biochemistry and Cell Biology 33:75-85, 2001.

ALVES KB, CASARINI DE, COSTA RH, PLAVINIC FL, PORTELA JE
 and MARSON O. Angiotensin converting enzymes (ACE)
 from urine of treated and untreated essencial mild
 hipeftensive patients (EHP) with diuretic: partial
 purification and characterization. Agents and Actions
 38/III: 270-277, 1992. COSTA RH, CASARINI DE, PORTELA
 JE, PLAVINIK FL, ALVES KB, MARSON O Enzimas
 conversoras de angiotensina en orina de hipertensos
 renovasculares, no tratados con diureticos:
 purification y caracterization. Revista Espanhola de
 Nefrologia 23(S5): 14 -17, 1993.

COSTA RH, CASARINI DE, PLAVNIK FL, MARSON O, ALVES
 KB. Angiotensin converting I-enzymes from urine of
 untreated renovascular hypertensive and normal
 patients: purification and characterization
 Immunopharmacology 46: 237-246, 2000.

BAGGIO B, FAVARO S, CANTARO S, BERTAZZO L, FUNZIO A,
 BORSATTI A. Increased urinary angiotensin
 converting enzyme in patients with upper tract
 infection. Clin Chim Acta 109: 211-218, 1981

KATO I, TAKATA K, NISHIMURA K, HIWADA K, KOKUBU T.
 Increased urinary excretion of angiotensin
 converting enzyme in patients with renal diseases.
J Clin Chem Clin Biochem 20: 473-476, 1982.

ANDRADE MCC, QUINTO BMR., CARMONA AK, RIBAS OS, BOIM MA,
 SCHOR N, CASARINI DE. Purification and
 characterization of angiotensin I-converting enzymes
 from mesangial cells in culture. Journal of
 Hypertension 16: 2063-2074, 1998.

HATTORI MA, DEL BEM G, CARMONA AK, CASARINI DE.

Angiotensin converting enzymes (high and low molecular weight) in urine of premature and full term infants.

Hypertension 35: 1284-1290, 2000.

89

90

REIVINDICAÇÕES

1. METODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM TECIDOS, CÉLULAS E FLUIDOS BIOLÓGICOS caracterizado pelas seguintes etapas:

(a) coletar uma aliquota de fluidos biológicos fresco ou concentrado, células ou tecidos de organismos vivos e submetê-los a análise e separação por método de e por Western Blotting;

(b) comparar a amostra em análise aos padrões previamente estabelecidos para os marcadores genéticos de hipertensão e 65 kDa.isoformas da ECA de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa. Uma aliquota de fluido (por exemplo, urina fresca ou concentrada utilizando como controles da análise as isoformas da ECA preparadas como padrões e a enzima recombinante da ECA;

(c) detectar a presença das isoformas de 190 kDa e 65 kDa em indivíduos normais e detectar a presença da isoforma de 90 kDa que caracterizará aqueles indivíduos predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos.

2. METODO de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que a isoforma de 90 kDa detectada na etapa (c) é o marcador genético de hipertensão e o agente prognóstico de hipertensão.

3. METODO de acordo com à reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que a separação cromatográfica da etapa (a) ser processada em resina AcA44 e/ou AcA 34; coluna de fase reversa C-18, espectrometro de massa e Western Blotting utilizando anticorpo específico contra ECA .

91

somática e contra ECA N-domínio [90 kDa e 65 kDa] das isoformas de 190 kDa, 90 kDa e 65 kDa.

4. MÉTODO de acordo com a reivindicação 1 a 3 caracterizado pelo fato do fluido biológico ser urina.
5. MÉTODO de acordo com as reivindicações 1 a 4 caracterizado pelo fato de serem detectados em urina de indivíduos normotensos dois picos com atividade conversora de angiotensina I com pesos moleculares de 190kDa e 65kDa.
10. 6. MÉTODO de acordo com as reivindicação 5 caracterizado pelo fato de se empregar cromatografia de troca iônica.
7. MÉTODO de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato de serem detectados em urina de indivíduos hipertensos um perfil onde foram eluídos dois picos com atividade conversora de angiotensina I com pesos moleculares de 90 kDa e de 65 kDa e não sendo detectada a forma de 170 kDa.
15. 8. MÉTODO de identificação do potencial da isoforma da enzima conversora de angiotensina I de 90 kDa caracterizado pelas seguintes etapas:
 - (a) concentrar e dialisar urina dialisadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e então submetidas a gel filtração em coluna AcA-34 equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, contendo NaCl 150 mM, pH 8,0;
 20. (b) As frações coletar 2 mL das frações e monitorar pela leitura de absorbância em A 280nm e pela atividade conversora de angiotensina I, utilizando Hipuril-L-His-L-Leu- e Z-Phe-His-Leu como substratos;
 25. (c) observar a presença das isoformas com atividade da ECA (170 kDa e 65 kDa) (n=21), das isoformas (170

kDa, 90 kDa e 65 kDa) (n=13) e das isoformas (90 kDa e 65 kDa) (n=13).

9. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que as duas isoformas com atividade da ECA (170 kDa e 65 kDa) (n=21) detectadas na etapa (c) serem provenientes de indivíduos normotensos com pais normotensos.

10. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que as três isoformas (170 kDa, 90 kDa e 65 kDa) (n=13) detectadas na etapa (c) serem provenientes de indivíduos normotensos com pais hipertensos.

15. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de que as duas isoformas (90 kDa e 65 kDa) (n=13) detectadas na etapa (c) serem provenientes de indivíduos hipertensos com pais hipertensos.

20. MÉTODO de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato de ser a isoforma de 90 kDa um marcador genético de hipertensão e um agente prognóstico de hipertensão.

13. MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO DE HIPERTENSÃO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS GENÉTICO obtido de acordo com as reivindicações de 1 a 12 caracterizado pelo fato de ser a base da isoforma de 90 kDa .

25. 14. USO DO MARCADOR GENÉTICO obtido de acordo com as reivindicações de 1 a 12 caracterizado pelo fato de ser empregado como agente prognóstico de hipertensão.

30. 15. USO do marcador genético obtido de acordo com as reivindicações 1 a 12 caracterizado pelo fato de ser no diagnóstico da predisposição ao desenvolvimento de hipertensão e lesões em órgãos alvo característicos.

16. USO de acordo com a reivindicação 15 caracterizado pelo
fado dos órgãos alvo serem o coração, sistema nervoso,
vasculatura e rim.

93

17. MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE
5 RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO
ARTERIAL E LESÕES RENAIAS caracterizado pelo fato de
detectar a presença das isoformas de 190 kDa e 65 kDa
em indivíduos normais e detectar a presença da isoforma
de 90 kDa que caracterizará aqueles indivíduos
10 predispostos ao desenvolvimento de hipertensão e lesões
em órgãos alvo característicos.

18. MÉTODO de acordo com a reivindicação 17 caracterizado
pelo fato de que a isoforma de 90 kDa detectada na etapa
é o marcador genético de hipertensão e o agente
15 prognóstico de hipertenso.

19. MÉTODO de acordo com a reivindicação 17 caracterizado
pelo fato de que o fluido biológico ser urina.

20. KIT PARA DIAGNÓSTICO caracterizado por conter o marcador
genético obtido de acordo com as reivindicações 1 a 12.

21. KIT PARA DIAGNÓSTICO caracterizado por conter o marcador
genético e a gente prognóstico de hipertensão.

22. KIT de acordo com as reivindicações 16 e 17
25 caracterizado pelo fato de ser para uso no diagnóstico,
estratificação de risco e decisão terapêutica na
hipertensão arterial.

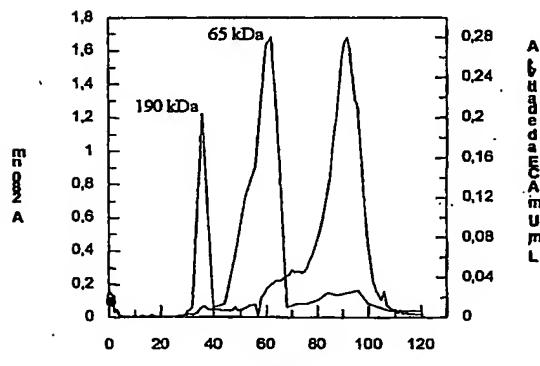
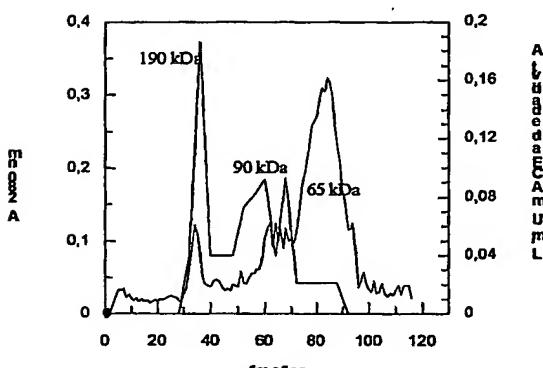
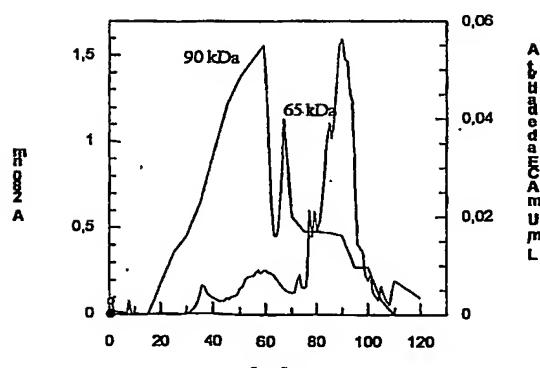
FIGURA 01(A, B, C)**FIG.01A****FIG.01B****FIG.01C**

FIG. 02

95

N-terminal:

	1	5	10	15
90 ACE	Asp Pro X	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser	X Asp Glu	Ala Gly Ala Gln Leu Phe
65 ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu	X Gly Ala Gln Leu Phe	
Somatic ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu Ala	Gly Ala Gln Leu Phe	
Rat ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Ala Asp Glu Ala	Gly Ala Gln Leu Phe	
Mouse ACE	Asp Pro Gly	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Ser Pro Asp Glu Ala	Gly Ala Gln Leu Phe	
Bovine ACE	Asp Pro Ala	Leu Gln Pro Gly Asn Phe Pro Ala Asp Glu Ala	Gly Ala Gln Ile Phe	

C terminal:**65 kDa ACE:****GYLVDQXRXGVFS****Somática: GLLDRVTDNTESDINYLLKMALEKIAFLPFGYLVDQWRWGVFSGRTPPSRY**

440

450

460

470

480

90 kDa ACE**EVLGXPEYQXHPP****Somática: VGLDALDAQPLLKYFQPVTQWLQEQNQQNGEVLGWPEYQWHPLPDNYPE**

590

600

610

620

630

FIG. 03

96

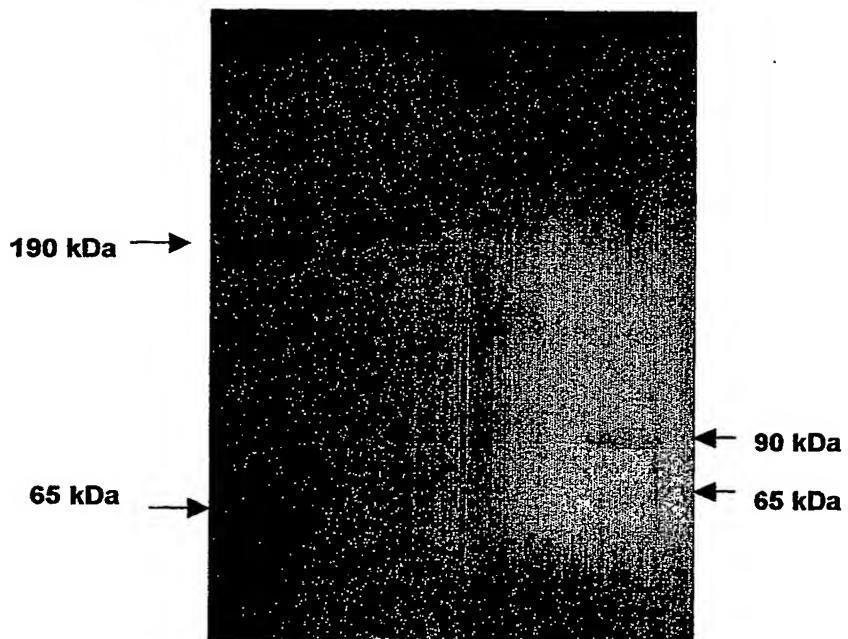


FIG. 04

97

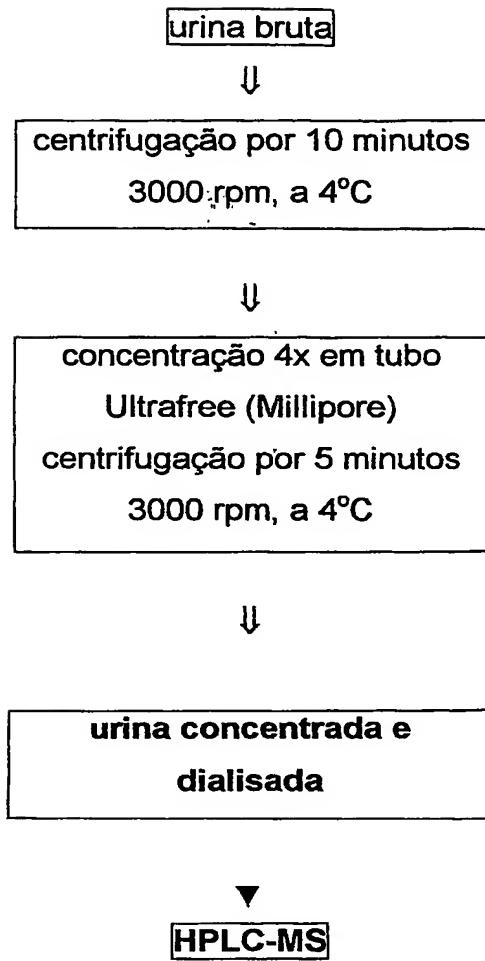


TABELA I:

9B

Linhagens	Enzimas	Eluição	Massa Molecular
		Fração (nº)	Estimada (kDa)
WKY	WK-1	32	190
	WK-2	54	65
SHR	S-1	50	80
	S-2	55	65
1K1C	C-1	32	140
	C-2	54	65
DOCA-Sal	D-1	34	190
	D-2	52	65
DOCA-Sal	CD-1	34	190
controle	CD-2	52	65
SHR-SP	SP-1	50	90
	SP-2	55	65
BN	BN-1	32	190
	BN-2	54	65
SHR	S-1	50	80
enalapril	S-2	55	65
Lyon	L-1	50	80
	L-2	55	65

TABELA II:

99

Tecidos	Wistar	Wistar Isogênico	SHR
Adrenal	137	137	96
	69	69	69
Aorta	137	137	96
	69	69	69
Coração	137	137	96
	69	69	69
Fígado	137	137	96
	69	69	69
Pulmão	137	137	96
	69	69	69
Rim	137	137	96
	69	69	69
Testículo	137	137	96
	69	69	69

P100000000

100

TABELA III:

Ratos	Extracelular	Intracelular
Wistar	130 kDa	135 kDa
	60 kDa	68 kDa
SHR	80 kDa	80 kDa
	60 kDa	68 kDa

RESUMO

101

MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, ISOFORMAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I, MARCADOR MOLECULAR GENÉTICO A BASE DAS REFERIDAS PROTEÍNAS, USO DO REFERIDO MARCADOR MOLECULAR, MÉTODO ANALÍTICO PARA DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO, DECISÃO TERAPÊUTICA EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL E LESÕES RENAIAS E KIT PARA USO NO DIAGNÓSTICO.

A presente invenção trata de um método de identificação e quantificação de proteínas, isoformas da enzima conversora de angiotensina I especificamente ECA, 19-kDa, especialmente 90 kDa em tecidos, células e fluidos biológicos, especialmente na urina; marcador genético e agente prognóstico de hipertensão a base das referidas proteínas, uso do referido marcador e agente em portadores de hipertensão arterial e lesões renais primárias ou secundária e kit para uso no diagnóstico, estratificação de risco e decisão terapêutica na hipertensão arterial.

Um dos objetivos da presente invenção consiste em verificar o potencial da isoforma de 90 kDa como um marcador genético de hipertensão e como um prognóstico de hipertensão.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.